

Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch posteriore *Hox*-Gene

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Stefanie Werner

aus Düsseldorf

Februar 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Nalbant

3. Gutachter: Prof. Dr. P. Bayer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
 1. EINLEITUNG.....	 1
1.1 Das Skelett der Vertebraten	1
1.2 Bildung von Knochen und Knorpel.....	2
1.2.1 Enchondrale Ossifikation.....	2
1.2.2 Die Funktion von Indian Hedgehog während der enchondralen Ossifikation	6
1.2.3 Regulation und genomische Organisation von <i>Indian Hedgehog</i>	8
1.2.4 Identifikation von cis-regulatorischen Elementen eines Gens	9
1.3 Hox-Gene	10
1.3.1 Hox-Cluster in Vertebraten	11
1.3.2 Bedeutung und Expression der <i>Hox</i> -Gene während der Gliedmaßenentwicklung.....	13
1.3.3 Regulation der Expression von <i>Hoxd</i> -Genen	13
1.3.4 <i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i> -Mauslinie	16
1.3.5 <i>Ulnaless</i> -Mutation der Maus.....	16
 2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	 18
3. MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Chemikalien.....	20
3.1.2 Radiochemikalien	20
3.1.3 Enzyme	21
3.1.4 Antikörper	21
3.1.5 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges.....	21
3.1.6 Geräte und Software	22
3.1.7 Lösungen, Puffer und Nährmedien	23
3.1.8 Bakterien- und Hefestämme	25
3.1.9 Mausstämme.....	26
3.1.10 Oligonukleotide	26
3.1.11 Vektoren.....	27
3.1.12 Klonierte Plasmide	29

3.2 Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.2.2 Gelelektrophorese	31
3.2.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	32
3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	32
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	33
3.2.6 Restriktionsspaltung von DNA	33
3.2.7 Dephosphorylierung von Vektoren	33
3.2.8 Ligation	34
3.2.9 Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.2.10 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien durch Elektroporation	35
3.2.11 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien durch Hitzeschock	35
3.2.12 TOPO TA-Klonierung	35
3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien	36
3.2.14 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese	37
3.2.15 Sequenzierung	37
3.3 Proteinchemische Methoden	37
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.2 Western Blot	38
3.4 Hefe-Kultur	39
3.4.1 Herstellung kompetenter Hefe nach der Lithiumacetat-Methode	39
3.4.2 Hefe-Ein-Hybrid System	40
3.4.3 Kolonie-PCR von Hefe-Klonen	42
3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	42
3.4.5 Protein-Extraktion aus Hefe nach der Ureas/SDS-Methode	42
3.5 Tierexperimenteller Ansatz	44
3.5.1 Tierversuche	44
3.5.2 Genotypisierung von Mäusen	44
3.5.3 Generierung transgener Mausembryonen	45
3.5.4 Genotypisierung transgener Embryonen	46
3.6 Histologie	46
3.6.1 Einbettung von Gliedmaßen der Maus in Paraffin	46
3.6.2 Anfertigung von Schnitten der Gliedmaßen am Mikrotom	47
3.6.3 Safranin-Weigert-Färbung	47
3.6.4 Von Kossa-Färbung	48
3.6.5 Färbung des Skeletts mit Alcianblau/Alizarinrot	49
3.6.6 X-Gal-Färbung von transgenen Embryonen	49

3.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	50
3.7.1	Radioaktive <i>in situ</i> Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten	50
3.7.2	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> Hybridisierung (<i>Whole mount</i>)	53
3.8	Zellbiologische Methoden	56
3.8.1	Kultivierung von primären Chondrozyten in Micromass-Kulturen	56
3.8.2	Alcianblau-Färbung von Micromass-Kulturen	57
3.8.3	Transiente Transfektion von mesenchymalen Zellen	57
3.8.4	Luciferase-Assay	58
3.8.5	Kultivierung von Gliedmaßen der Maus	59
3.9	Statistische Auswertung	59
4.	ERGEBNISSE	60
4.1	Analyse von <i>Hoxa11</i>^{-/-}; <i>d11</i>^{-/-}- und <i>Ulnaless</i>-Vorderextremitäten	60
4.1.1	Phänotyp der Vorderextremitäten von <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Mäusen	60
4.1.2	Die Ulna von <i>Ulnaless</i> -Mäusen dient als Modell der <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} -Mutation	61
4.1.3	Deutlich verzögerte hypertrophe Differenzierung im Zeugopod von <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Mutanten	66
4.1.4	Die Chondrozyten der Ulna von E13.5 <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen besitzen keine Kompetenz zur hypertrophen Differenzierung	75
4.1.5	Retinsäure hat keinen Einfluss auf die Chondrogenese im Zeugopod von <i>Ulnaless</i> - und <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} -Mutanten	76
4.1.6	Zellautonomer Defekt der Chondrozytendifferenzierung in der Ulna von <i>Ulnaless</i> -Vorderextremitäten	78
4.1.7	<i>Runx2</i> und <i>Shox2</i> sind putative Zielgene von <i>Hoxa11</i> und <i>Hoxd11</i>	79
4.1.8	Die Ulna von <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen gleicht dem Olecranon	81
4.1.9	Kompensation von <i>Hoxa11</i> und <i>Hoxd11</i> in den Hintergliedmaßen von <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} -Mutanten durch erhöhte <i>Hoxc11</i> -Expression	85
4.2	Identifikation von Enhancern und Transkriptionsfaktoren zur Regulation der <i>Ihh</i>-Expression	86
4.2.1	Identifikation von konservierten Bereichen in der 5'Region von <i>Ihh</i>	86
4.2.2	Regulation der <i>Ihh</i> -Expression <i>in vivo</i>	88
4.2.3	Regulation der Expression von <i>Indian Hedgehog</i> <i>in vitro</i>	91
4.2.4	MMP3 ist ein putativ regulatorisches Protein der <i>Ihh</i> -Expression	93

5. DISKUSSION	97
5.1 Funktion von Hoxa11 und Hoxd11 während der Gliedmaßenentwicklung.....	97
5.1.1 Regulation der Chondrozytendifferenzierung in Ulna und Radius durch Hoxa11 und Hoxd11	98
5.1.2 <i>Shox2</i> ist ein putatives Zielgen von Hoxa11 und Hoxd11	100
5.1.3 Hoxa11 und Hoxd11 regulieren die räumliche Orientierung der Chondrozyten im Zeugopod	101
5.1.4 Zellautonome Regulation der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod durch Hoxa11 und Hoxd11	103
5.1.5 Verlust der distalen Ulna in <i>Ulnaless</i> -Mutanten	104
5.2 Identifikation von Gliedmaßen-spezifischen Enhancern und regulatorischen Proteinen von <i>Ihh</i>	106
5.2.1 Regulation der Expression von <i>Ihh</i> durch Homöobox-Transkriptionsfaktoren	106
5.2.2 Der proximale <i>Ihh</i> -Promotorbereich ist nicht ausreichend zur Aktivierung der Expression von <i>Ihh</i> in Chondrozyten	108
5.2.3 MMP3 ist ein putativer Regulator der <i>Ihh</i> -Expression	109
5.3 Modell zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung.....	110
6. ZUSAMMENFASSUNG	111
7. ABSTRACT.....	113
8. LITERATURVERZEICHNIS	115
9. ANHANG.....	124
DANKSAGUNG	129
PUBLIKATIONEN.....	130
LEBENS LAUF	131
ERKLÄRUNGEN	132

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	bakterielles, artifizielles Chromosom
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
E	Embryonalstadium
E. coli	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
His	Histidin
Hox	Homöobox
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
k (Präfix)	kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
M	Molar

M (Präfix)	Mega (10^6)
m (Präfix)	milli (10^{-3})
MCS	<i>multiple cloning site</i>
μ (Präfix)	mikro (10^{-6})
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
n (Präfix)	nano (10^{-6})
Neo	Neomycin
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	postnatales Stadium
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEA	Tris-EDTA-Acetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
x	fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
Ω	Ohm

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Skelettelemente der Vorderextremität der Maus	1
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Ihh/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus... 7	
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des murinen <i>Ihh</i> -Gens	8
Abb. 1.5: <i>Antennapedia</i> -Mutation in <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Abb. 1.6: Vergleich der <i>Hox</i> -Gencluster von <i>Drosophila</i> und Vertebraten.....	12
Abb. 1.7: Festlegung der Identität der einzelnen Elemente der Vordergliedmaßen durch posteriore <i>Hox</i> -Gene	13
Abb. 1.8: Regulation der <i>Hoxd</i> -Genexpression während der frühen Entwicklung der Gliedmaßen.....	15
Abb. 1.9: Modell zur Regulation der <i>Hoxd</i> -Expression durch GCR und <i>Prox</i>	15
Abb. 1.10: Schematische Darstellung der <i>Hoxd</i> -Region auf dem Wildtyp (wt)- und <i>Ulnaless</i> (<i>U</i>)-Chromosom	17
Abb. 3.1: Prinzip des Hefe-Ein-Hybrid Systems	40
Abb. 3.2: Karten der im Hefe-Ein-Hybrid System verwendeten Vektoren.....	41
Abb. 3.3: Schematische Darstellung des pGZ40-Vektors.....	46
Abb. 3.4: Karten der verwendeten Luciferase-Vektoren	59
Abb. 4.1: Die Vorderextremitäten von <i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i> und <i>Ulnaless</i> -Mäusen sind erheblich verkürzt.....	61
Abb. 4.2: Die Chondrozyten in Ulna und Radius von E14.5 <i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i> - Gliedmaßen entsprechen dem distalen Zelltyp.....	62
Abb. 4.3: In der Ulna von E14.5 <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen sind keine kolumnaren und hypertrophen Chondrozyten vorhanden	63
Abb. 4.4: Die kolumnaren Chondrozyten im Radius von E16.5 <i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i> - Gliedmaßen sind senkrecht zur longitudinalen Achse orientiert	64
Abb. 4.5: In der Ulna von E16.5 <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen ist die Differenzierung der Chondrozyten blockiert.....	65

Abb. 4.6: Hypertrophe Chondrozyten sind in der Ulna von E14.5 <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Extremitäten nicht vorhanden	67
Abb. 4.7: Die frühe Chondrozytendifferenzierung ist in <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen nicht gestört.....	68
Abb. 4.8: Die <i>Fgfr3</i> -Expression in der Ulna von E14.5 <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen weist auf schwach-proliferierende, distale Chondrozyten hin.	69
Abb. 4.9: Die Chondrozyten in der Ulna von E16.5 <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Extremitäten besitzen keine distale Zellidentität.	71
Abb. 4.10: Die Chondrozyten in Ulna und Radius von <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} -Mutanten differenzieren erst im Stadium E18.5 zu hypertrophen Zellen	72
Abb. 4.11: Die hypertrophe Differenzierung findet im Zentrum der Ulna von E18.5 <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen statt	73
Abb. 4.12: Die hypertrophe Differenzierung in der Ulna von <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - und <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen ist erheblich verzögert	74
Abb. 4.13: Die Chondrozyten in der Ulna von E13.5 <i>Ulnaless</i> -Extremitäten besitzen keine Fähigkeit, zu hypertrophen Zellen zu differenzieren.....	76
Abb. 4.14: Die Expression von <i>Raldh2</i> ist in E12.5 <i>Ulnaless</i> - und <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} - Vordergliedmaßen unverändert	77
Abb. 4.15: Micromass-Kulturen von primären Chondrozyten aus E12.5 <i>Ulnaless</i> -Vorderextremitäten zeigen eine verringerte Differenzierung.....	79
Abb. 4.16: <i>Runx2</i> und <i>Shox2</i> sind mögliche Zielgene von posterioren <i>Hox</i> -Genen	80
Abb. 4.17: Die Ulna von <i>Ulnaless</i> -Extremitäten mineralisiert im Stadium E18.5 wie ein Knochen des Carpus	82
Abb. 4.18: Die Expression von Markern für Handwurzelknochen ist in der Ulna von <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen unverändert	83
Abb. 4.19: Die Ulna von P6 <i>Ulnaless</i> -Gliedmaßen gleicht dem Olecranon im Wildtyp	84
Abb. 4.20: Die erhöhte <i>Hoxc11</i> -Expression in <i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-} -Hintergliedmaßen kompensiert den Verlust von <i>Hoxa11</i> und <i>Hoxd11</i>	86

Abb. 4.21: Vergleich der genomischen Sequenzen des 5'Bereichs und des ersten Introns von <i>Ihh</i> verschiedener Spezies	87
Abb. 4.22: Schematische Darstellung der 5'Region von <i>Ihh</i> mit konservierten Bereichen	88
Abb. 4.23: Die analysierten Sequenzen zeigen keine <i>Ihh</i> -Enhancer-Aktivität <i>in vivo</i>	90
Abb. 4.24: Regulation der <i>Ihh</i> -Enhancer-Elemente in mesenchymalen Zellen.....	92
Abb. 4.25: Der Inhibitor 3-AT muss mit einer Konzentration von 170 mM eingesetzt werden.....	94
Abb. 4.26: Nachweis von humanem MMP3 in dem Hefe-Klon Nr. 45	96
Abb. 5.1: Modell der ermittelten Signalkaskade zur Regulation der Differenzierung von Chondrozyten.....	101
Abb. 5.2: Modell zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung.....	110
Abb. 9.1: Transgene Embryonen für Intron-pGZ40.	124
Abb. 9.2: Transgene Embryonen für T5-pGZ40	124
Abb. 9.3: Transgene Embryonen für T1-pGZ40	125
Abb. 9.4: Transgene Embryonen für T3-pGZ40	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Programme zum Einbetten von Extremitäten unterschiedlicher Stadien.....	47
Tab. 2: Anzahl der untersuchten Embryonen pro Enhancer-pGZ40-Konstrukt.....	89
Tab. 3: Sequenzierungsergebnisse der isolierten Klone des Hefe-Ein-Hybrid Systems	127

1. Einleitung

1.1 Das Skelett der Vertebraten

Das Skelett der Wirbeltiere ist ein komplexes Organ, das aus über 200 Knochen besteht und viele verschiedene Aufgaben erfüllt. Es dient nicht nur als Stützapparat, sondern übernimmt auch eine Schutzfunktion der inneren Organe, wie Herz und Lunge, und ermöglicht zusammen mit den Muskeln die Fortbewegung. Außerdem ist es an der Kalzium-Homöostase und der Blutbildung im Knochenmark beteiligt. Anatomisch wird das Skelett in kraniales, axiales und appendikuläres Skelett unterteilt (Kaufmann, 1992). Das Axialskelett setzt sich aus der Wirbelsäule und den Rippen zusammen und schließt mit dem kranialen Skelett, dem Schädel, ab. Das appendikuläre Skelett besteht aus den oberen und unteren Extremitäten, welche über Schulter- und Beckengürtel mit dem Axialskelett verbunden sind.

Da sich diese Arbeit auf die Analyse von Vorderextremitäten konzentriert, wird nur der Aufbau der Vordergliedmaßen näher erläutert. Die Vordergliedmaßen bestehen von proximal nach distal aus dem Schulterblatt (Scapula), dem Oberarmknochen (Humerus), den beiden Unterarmknochen Elle (Ulna) und Speiche (Radius), den Knochen der Handwurzel (Carpus), den Knochen der Mittelhand (Metacarpus) und den Fingergliedern (Phalangen) (Abb. 1.1) (Kaufmann, 1992). Eine weitere Bezeichnung der Elemente der Vorderextremität sind Stylopod (Humerus), Zeugopod (Ulna, Radius) und Autopod (Carpus, Metacarpus, Phalangen).

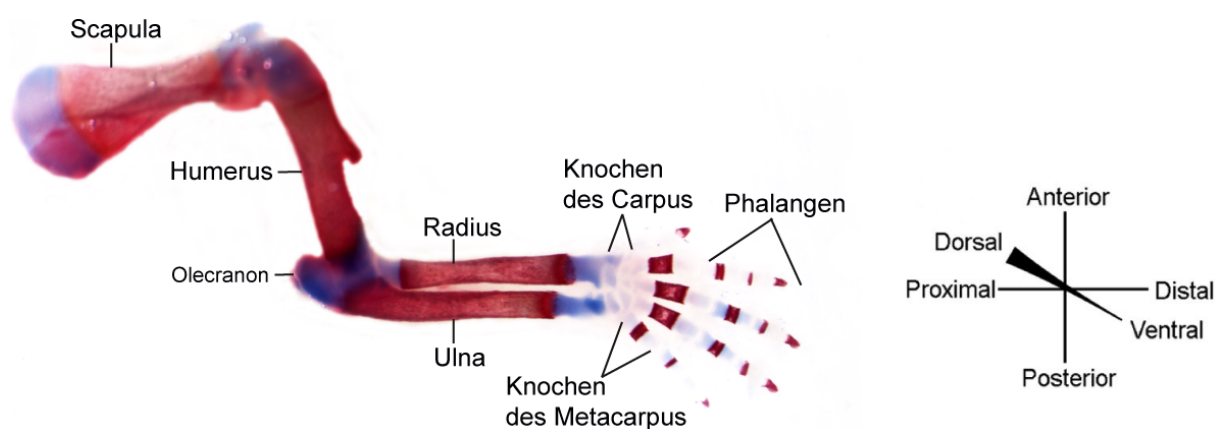


Abb. 1.1: Skelettelemente der Vorderextremität der Maus. Von proximal nach distal sind die Vordergliedmaßen unterteilt in Scapula, Humerus, Radius (anterior), Ulna (posterior), Knochen des Carpus, Knochen des Metacarpus und die Phalangen. Das proximale Ende der Ulna wird als Olecranon bezeichnet.

1.2 Bildung von Knochen und Knorpel

Die Bildung des Skeletts beginnt bereits in der Embryonalentwicklung. Dabei werden die Knochen auf zwei verschiedene Arten aus dem Mesenchym gebildet. Durch den Prozess der desmalen Ossifikation werden die Knochen des Schädeldachs, die meisten Gesichtsknochen und Teile des Schlüsselbeins gebildet. Dabei differenzieren die mesenchymalen Zellen direkt zu knochenbildenden Osteoblasten. Im Gegensatz dazu entstehen die meisten Knochen, wie z.B. die Röhrenknochen, die Rippen und die Wirbel durch den Prozess der enchondralen Ossifikation (Erlebacher et al., 1995; Gilbert, 2003; Olsen et al., 2000).

1.2.1 Enchondrale Ossifikation

Die enchondrale Ossifikation ist ein mehrstufiger Prozess, bei der die Bildung des Knochens über eine Knorpel-Zwischenstufe erfolgt (Abb. 1.2) (Erlebacher et al., 1995; Gilbert, 2003; Olsen et al., 2000). Der erste Schritt der enchondralen Ossifikation besteht in der Aggregation und Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen an der Position des zukünftigen Skelettelements. Durch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Knorpelzellen (Chondrozyten) bildet sich eine knorpelige Skelettanlage. Die Chondrozyten dieser Knorpelanlage produzieren eine aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen bestehende extrazelluläre Matrix, die dem Knorpel Festigkeit und Druckelastizität verleiht. Um die Knorpelanlage herum bildet sich eine Schicht Fibroblasten-ähnlicher Zellen, das sogenannte Perichondrium. Signale des Perichondriums interagieren mit denen der Chondrozyten, um die Differenzierung der Knorpelanlage zu steuern. In den frühen mesenchymalen Kondensationen ist der Transkriptionsfaktor *SRY-box containing gene 9* (Sox9) essentiell, damit die mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten differenzieren können. Studien mit chimären Sox9^{-/-}-Mäusen zeigten, dass die homozygot mutanten Sox9-Zellen nicht in der Lage waren, zu Chondrozyten zu differenzieren und Chondrozytenmarker wie das extrazelluläre Matrixprotein *Typ-II-Kollagen* (Col2a1) zu exprimieren (Bi et al., 1999). Sox9 ist demnach für die Expression Knorpel-spezifischer, extrazellulärer Matrixkomponenten wie Col2a1, Col9a2, Col11a2 oder Aggrecan erforderlich (Lefebvre und de Crombrughe, 1998).

In einem weiteren Schritt der enchondralen Ossifikation setzt, ausgehend vom Zentrum des Knorpелеlements, ein Differenzierungsprozess ein, der über mehrere Stufen zur Bildung von nicht-proliferierenden, hypertrophen Chondrozyten führt, die den Blasenknorpel darstellen. Die Chondrozytendifferenzierung beginnt mit der Bildung von kleinen, runden Chondrozyten, die als distale Chondrozyten bezeichnet werden. Diese schwach-proliferierenden, distalen Chondrozyten differenzieren daraufhin zu stark-proliferierenden, kolumnaren Chondrozyten, die den Säulenknorpel bilden. Diese kolumnaren Chondrozyten ordnen sich longitudinal in Säulen an, wodurch das Längenwachstum des Knorpels ermöglicht wird. In proliferierenden Chondrozyten werden weiterhin *Sox9* und *Col2a1* exprimiert, wobei Typ-II-Kollagen ein spezifisches Protein der Knorpelmatrix ist (Ng et al., 1997; Wright et al., 1995; Zhao et al., 1997). Ein weiterer Marker für proliferierende Chondrozyten ist *Fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3)*, der stark in kolumnaren Chondrozyten exprimiert ist (Minina et al., 2005).

Der Abschluss der Chondrozytendifferenzierung erfolgt durch die hypertrophe Differenzierung, wobei die Zellen aufhören zu proliferieren. Das Längenwachstum des Knorpels wird jedoch durch die Volumenzunahme der Chondrozyten fortgesetzt. Parallel zur hypertrophen Differenzierung entwickeln sich die Zellen des Perichondriums, die an die hypertrophe Region angrenzen, zu Osteoblasten. Dadurch entsteht das Periost (Knochenhaut), das die Bildung von kortikalem Knochen initiiert. Während der hypertrophen Differenzierung entstehen zuerst prähypertrophe Chondrozyten, die das Gen *Indian hedgehog (Ihh)* exprimieren (St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996). Daraufhin bilden sich hypertrophe Chondrozyten, die durch die Produktion des extrazellulären Matrixproteins Typ-X-Kollagen (*Col10a1*) charakterisiert werden (Elima et al., 1993; Olsen et al., 2000). Durch die Sekretion von Typ-X-Kollagen in die Matrix wird ein Grundgerüst für die Mineralisierung durch Hydroxylapatit $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$ geschaffen (Lüllmann-Rauch, 2003). Im letzten Schritt der hypertrophen Differenzierung entstehen terminal hypertrophe Chondrozyten, die die Matrix Metalloproteinase 13 (*Mmp13*) produzieren (Gack et al., 1995) und schließlich durch Apoptose absterben. Die Kollagenase *Mmp13* initiiert die Zersetzung der extrazellulären Matrix des Knorpels und erleichtert somit die Invasion der aus dem Periost kommenden Blutgefäße.

Mit dem Einwandern der Blutgefäße beginnt die Bildung von trabekulärem Knochen. Osteoblasten und Osteoklasten gelangen mit den Blutgefäßen in die hypertrophe Region und beginnen den hypertrophen Knorpel durch trabekulären Knochen zu ersetzen. Die verbliebene Knorpelmatrix wird teilweise durch Osteoklasten zersetzt, wird aber auch von Osteoblasten als Gerüst für die Ablagerung von Knochenmatrix benutzt.

Ausgehend von diesem, in der Mitte der Knorpelanlage liegenden, primären Ossifikationszentrum, schreitet die enchondrale Ossifikation in Richtung der Gelenke fort. Dort kommt es postnatal zur Ausbildung von sekundären Ossifikationszentren. Zwischen dem primären und sekundären Ossifikationszentrum bleibt eine Zone aus proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten bestehen. Diese Zone wird als Wachstumsfuge bezeichnet und verkürzt sich im Laufe der Osteogenese. Während beim Mensch die Wachstumsfuge nach der Pubertät komplett durch Knochen ersetzt wird, so verknöchert in der Maus nicht die gesamte Wachstumsfuge. Das Längenwachstum des Knochens wird jedoch beendet. Um den trabekulären Knochen hat sich außerdem die Knochenmanschette, der kortikale Knochen, gebildet. Knorpel ist im adulten Organismus nur noch an wenigen Stellen zu finden, wie beispielsweise als artikulärer Knorpel in den Gelenken, als elastischer Knorpel in der Ohrmuschel oder als Faserknorpel in den Zwischenwirbelscheiben.

Die zeitliche Abfolge der enchondralen Ossifikation ist bei den verschiedenen Skelettelementen zeitversetzt. In Ulna und Radius der Maus beginnt die enchondrale Ossifikation im Embryonalstadium 11 (E11) mit der Kondensation des Mesenchyms im Bereich der zukünftigen Skelettelemente. Am Tag E12 ist bereits eine Knorpelanlage mit proliferierenden Chondrozyten zu erkennen. Im Stadium E14 können hypertrophe Chondrozyten nachgewiesen werden und am Tag E16 mineralisierte Knochenmatrix. Die Differenzierung des Humerus beginnt dagegen etwas früher und die der Phalangen etwas später.

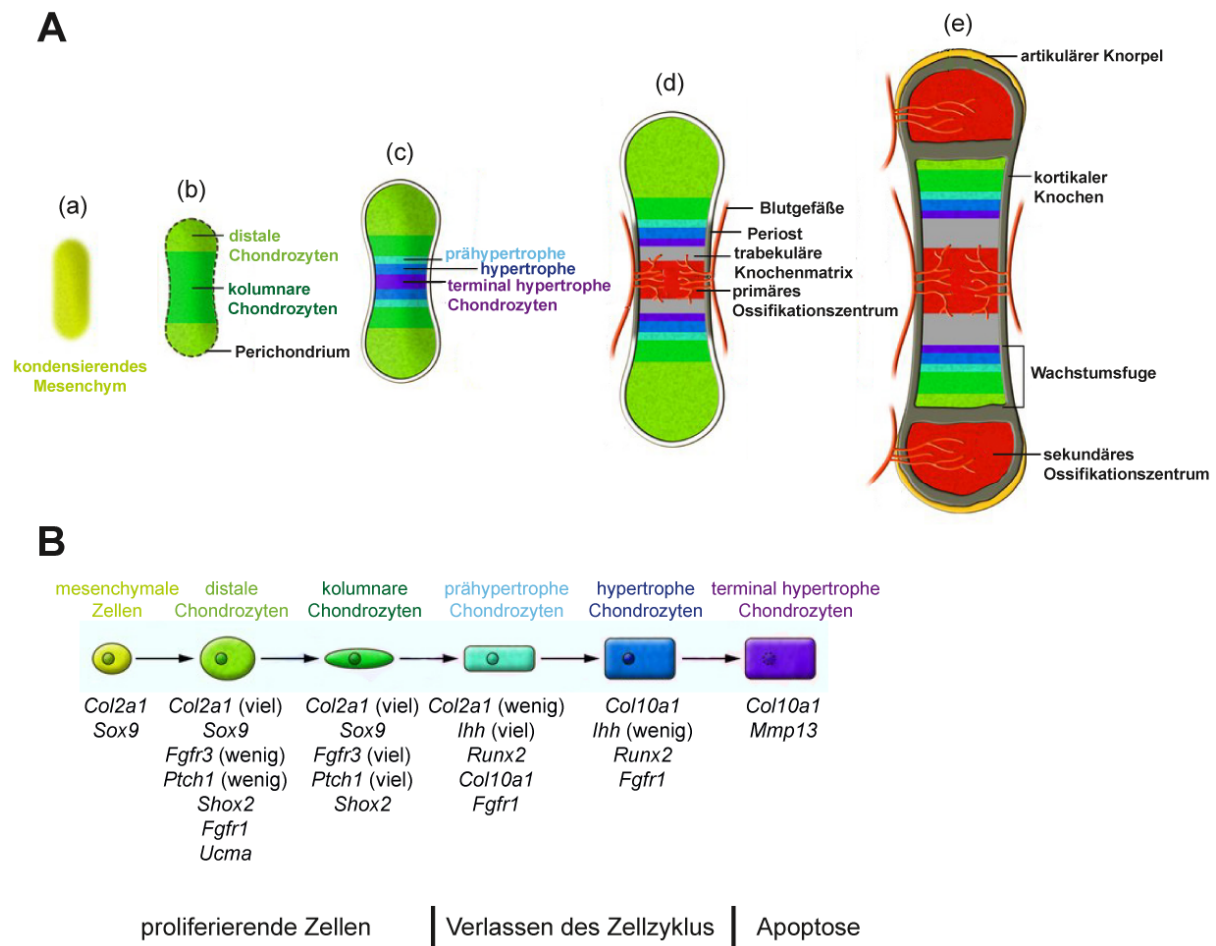


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation. A: Die enchondrale Ossifikation beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Zellen (a), die daraufhin zu Chondrozyten differenzieren. Um die Chondrozyten bildet sich das Perichondrium (b). In der Mitte der Knorpelanlage differenzieren die Chondrozyten von distalen Chondrozyten zu kolumnaren, prähypertropen, hypertropen und terminal hypertropen Chondrozyten (b, c). Das an die hypertropen Zellen angrenzende Perichondrium verknöchert, wodurch das Periost entsteht, das die Bildung des kortikalen Knochens initiiert. In die Knorpelanlage wandern schließlich mit den Blutgefäßen Osteoblasten und Osteoklasten ein, die den trabekulären Knochen bilden (d). Ausgehend vom primären Ossifikationszentrum schreitet die enchondrale Ossifikation fort und es kommt zur Ausbildung der Wachstumsfugen und der sekundären Ossifikationszentren. Nur in der Wachstumsfuge und im Gelenk ist noch Knorpel enthalten. Der Gelenkknorpel wird als artikulärer Knorpel bezeichnet (e). B: Model der Chondrozytendifferenzierung. Chondrozytenmarker, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind unter dem Differenzierungsstadium der Chondrozyten aufgelistet, in dem sie exprimiert werden. In Klammern ist das Expressionslevel angegeben. (verändert nach Zuscik et al., 2008).

1.2.2 Die Funktion von Indian Hedgehog während der enchondralen Ossifikation

Der Wachstumsfaktor Indian Hedgehog (Ihh) gehört zur Hedgehog (Hh)-Familie und ist ein Schlüsselmolekül der enchondralen Ossifikation. Während dieser wird Ihh in prähypertrophen Chondrozyten synthetisiert. Ihh bindet an seinen Rezeptor, das 12-Transmembranprotein Patched homolog 1 (Ptch1), wodurch das G-Proteingekoppelte 7-Transmembranprotein Smoothed (Smo) aktiviert wird. Durch die Aktivierung von Smo wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die unter Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der GLI-Kruppel-Familie zur Aktivierung verschiedener Zielgene, wie *Ptch1* und *Gli1*, führt. Bei Abwesenheit von Ihh reprimiert Ptch1 das Membranprotein Smo (Kronenberg, 2003). Der Hh-Signalweg kann durch Cyclopamin inhibiert werden. Cyclopamin ist ein Alkaloid der Nieswurz (*Veratrum californicum*), das teratogenes Potential besitzt. Es induziert Missbildungen, die sich in einer fehlenden Zweiteilung der Hirnsphären (Holoprosencephalie) sowie in Störungen der Gliedmaßenentwicklung äußern (Keeler, 1970; Keeler, 1973). Die molekularen Ursachen der teratogenen Wirkung von Cyclopamin beruhen auf der Bindung von Cyclopamin an Smo, wodurch der Signalweg von Hh blockiert wird (Chen et al., 2002). Durch die Inhibition des Ihh-Signalwegs kommt es zur Induktion der *Ihh*-Expression (Minina et al., 2001).

Ihh besitzt verschiedene Aufgaben während der enchondralen Ossifikation. Sowohl die Proliferation der Chondrozyten als auch die Differenzierung von Osteoblasten werden durch Ihh direkt reguliert. Hinweise auf diese Funktionen lieferten die Analysen verschiedener Mausmodelle. *Ihh*-defiziente Mäuse (*Ihh*^{-/-}) weisen stark verkürzte Skelettelemente auf, da die Proliferationsrate stark vermindert ist (St-Jacques et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist die Proliferation in *Ihh*-überexprimierenden Mäusen erhöht (Long et al., 2001). Ein weiterer Phänotyp von *Ihh*^{-/-}-Mutanten ist der Verlust von Osteoblasten in enchondralen Knochen. Außerdem wird in *Ihh*^{-/-}-Mäusen das Parathyroid hormone-related protein (PTHrP; Pthlh - Mouse Genome Informatics) nicht in den Chondrozyten synthetisiert. Dadurch kommt es zu einer vorzeitigen, hypertrophen Differenzierung (St-Jacques et al., 1999). In *PTHrP*^{-/-}-Mäusen erfolgt die hypertrophe Differenzierung auch früher als im Wildtyp. PTHrP ist ein sezerniertes Protein, das in gelenksnahen (periartikulären) Chondrozyten exprimiert wird. Es signalisiert durch den Parathyroid hormone 1 receptor (PPR; Pth1r - Mouse Genome Informatics), der schwach in proliferierenden

und stark in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Lee et al., 1995). In proliferierenden Chondrozyten bewirkt PTHrP, dass die hypertrophe Differenzierung blockiert wird und die Zellen weiter proliferieren. Da PTHrP nur in periartikulären und nicht in hypertrophen Chondrozyten produziert wird, wird vermutet, dass PTHrP in die Zone hypertropher Chondrozyten diffundiert. Dadurch entsteht ein PTHrP-Gradient, wodurch Chondrozyten, die nicht genügend durch PTHrP stimuliert werden, nicht mehr proliferieren, sondern zu Ihh-sezernierenden, prähypertrophen Chondrozyten differenzieren. Ihh aktiviert dann wiederum die Synthese von PTHrP in periartikulären Chondrozyten. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus reguliert somit den Beginn der hypertrophen Differenzierung und damit die Distanz von der Gelenksregion zu den hypertrophen Chondrozyten (Abb. 1.3). Dieser Ihh/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus wurde als Erstes durch virale Überexpression von *Ihh* in Hühner-Gliedmaßen bewiesen. Durch die *Ihh*-Überexpression kommt es zur Aktivierung der *PTHrP*-Expression in der periartikulären Region der infizierten Gliedmaßen und zur Blockierung der hypertrophen Differenzierung (Vortkamp et al., 1996). Durch Behandlung der Gliedmaßen von *PTHrP*^{-/-}- oder *PPR*^{-/-}-Mäusen mit Hh-Protein wurde die hypertrophe Differenzierung jedoch nicht verhindert (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996).

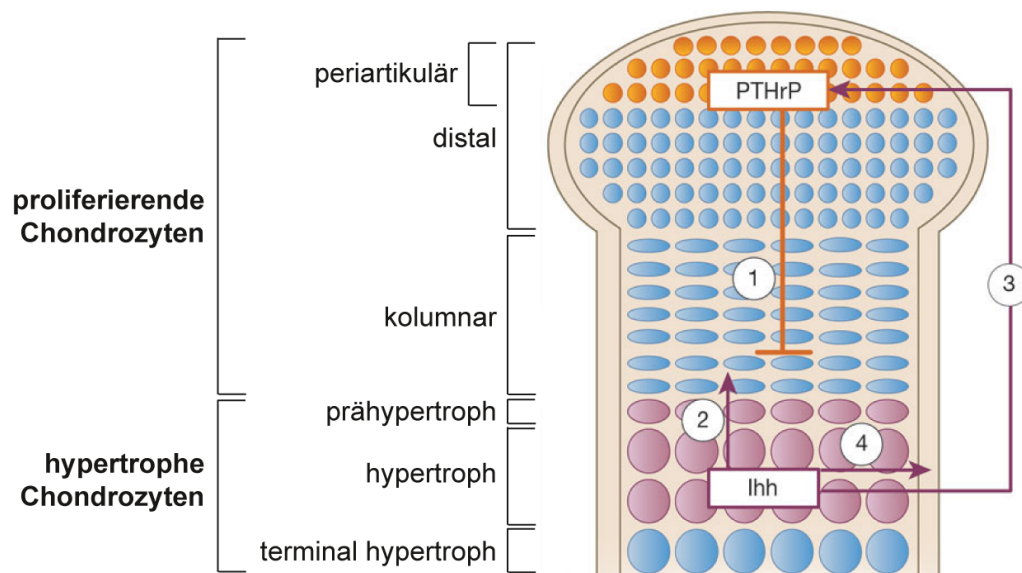


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Ihh/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus. PTHrP wird von periartikulären Chondrozyten sekretiert, veranlasst die Chondrozyten zu proliferieren und inhibiert den Beginn der hypertrophen Differenzierung (1). Sobald die PTHrP-Quelle zu weit entfernt ist, wird Ihh produziert, das positiv auf die Proliferation wirkt (2). Außerdem stimuliert Ihh die Synthese von PTHrP in periartikulären Zellen (3). Des Weiteren hat Ihh Einfluss auf die Differenzierung zu Osteoblasten im Perichondrium (4). (verändert nach Kronenberg, 2003).

1.2.3 Regulation und genomische Organisation von *Indian Hedgehog*

Während bereits viele Funktionen des Wachstumsfaktors *Ihh* beschrieben wurden, so ist jedoch erst wenig über die Regulation der *Ihh*-Expression bekannt. Bisher wurde für Runx2, Smad4 und Lef1 gezeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren die *Ihh*-Expression regulieren können (Seki und Hata, 2004; Spater et al., 2006; Yoshida et al., 2004). Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die molekularen Mechanismen im Einzelnen aufzuschlüsseln, die die Expression von *Ihh* regulieren. Das murine *Ihh*-Gen ist auf dem minus-Strang des Chromosoms 1 lokalisiert. Die genomische Sequenz umfasst 6,33 kb und beinhaltet drei Exons. Sowohl in Exon 1 als auch in Exon 3 ist eine große, untranslatierte Region (UTR) zu finden. Das Startcodon (ATG) befindet sich in Exon 1 (Abb. 1.4). Das *Ihh*-Transkript besitzt eine Länge von 2,46 kb und kodiert das *Ihh*-Protein mit 449 Aminosäuren (NCBI m37). In der Promotor-Region von *Ihh* ist eine CpG-Insel mit einem GC-Gehalt von circa 60% lokalisiert (UCSC Genome Browser). Dies liefert einen Hinweis auf eine Regulation der *Ihh*-Expression durch Methylierung. Allerdings sind CpG-Inseln in Eukaryoten im Gegensatz zu CpG-Dinukleotiden häufig nicht methyliert. Jedoch wurde auch bereits die Methylierung von CpG-Inseln beschrieben, wodurch es zur Repression des entsprechenden Gens kommt. Methylierte CpG-Inseln sind ein wichtiger Bestandteil bei den Mechanismen der X-Chromosom-Inaktivierung, der Erhaltung von imprinteten Genen und sogar bei der Zelltyp-spezifischen Genexpression (Strathdee et al., 2004).

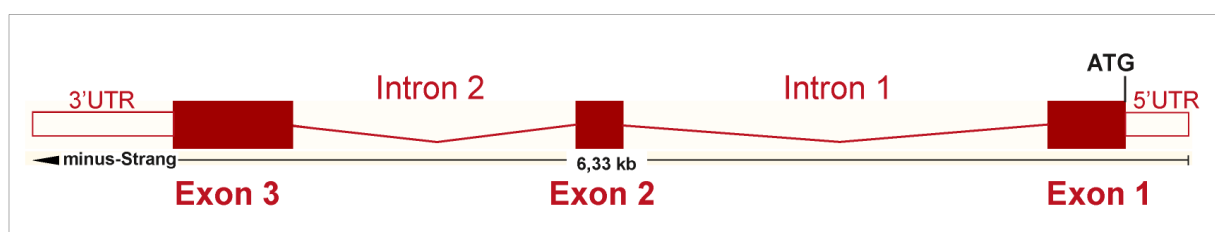


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des murinen *Ihh*-Gens. *Ihh* wird vom minus-Strang des Chromosoms 1 transkribiert und besteht aus drei Exons, wobei Exon 1 und Exon 3 größtenteils untranslatierte Regionen (UTR) darstellen. Das Startcodon (ATG) ist in Exon 1 zu finden. Die genomische *Ihh*-Sequenz beträgt 6,33 kb.

1.2.4 Identifikation von cis-regulatorischen Elementen eines Gens

Die Transkription eines Gens ist abhängig von Transkriptionsfaktoren, die an cis-regulatorische Regionen des Gens binden können und somit die Transkription positiv oder negativ beeinflussen können. Distale, regulatorische DNA-Sequenzen, die die Transkriptionsrate eines Gens steigern können, werden als Enhancer bezeichnet. Diese Enhancer sind nicht nur außerhalb eines Gens lokalisiert, sondern können auch innerhalb eines Gens, in Introns, liegen (Brooks et al., 1994; Muller et al., 1999; Zhou et al., 1995). Zur Identifikation von cis-regulatorischen Elementen eines Gens bestehen viele Möglichkeiten. Eine Methode ist das phylogenetische Footprinting, bei dem ein Sequenzvergleich zwischen evolutionär divergierenden Spezies durchgeführt wird. Dadurch werden orthologe DNA-Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit, sogenannte konservierte Regionen, ermittelt. Dieser Methode liegt die Annahme zugrunde, dass funktionale Bereiche einer hohen evolutionären Selektion unterliegen. Aufgrund dessen verändern sich diese Bereiche langsamer und weisen weniger Mutationen als nicht-funktionale Bereiche auf (Zhang und Gerstein, 2003). Zur experimentellen Verifikation von regulatorischen Sequenzen werden neben biochemischen Methoden (elektrophoretischer Mobilitätstest, Chromatin-Immunopräzipitation) auch Reporter-gen-Assays angewandt. Der Vorteil der Reporter-gen-Assays ist, dass regulatorische Sequenzen *in vivo* identifiziert und analysiert werden können. Distale, regulatorische Sequenzen werden hierbei vor einen schwachen Promotor und ein Reporter-gen kloniert. Nach Transfektion dieses Konstrukts in Zellen oder Mikroinjektion des Konstrukts in Embryonen wird die Stärke der Reporter-gen-Aktivität und deren Lokalisation im Gewebe bestimmt. Als Reportergene werden häufig das Grün-fluoreszierende Protein (GFP), Luciferase oder β -Galaktosidase verwendet.

1.3 *Hox*-Gene

Bereits 1894 untersuchte William Bateson natürlich auftretende Mutationen in *Drosophila melanogaster*, in denen ein Körperteil in ein anderes umgewandelt wurde. Bateson bezeichnete dieses Phänomen als homöotische Transformation (Bateson, 1894). Nachfolgende Arbeiten von Edward Lewis zeigten, dass die homöotischen Transformationen bei *Drosophila* auf Mutationen in *Hox*-Genen zurückzuführen sind (Lewis, 1978). Ein bekanntes Beispiel einer homöotischen Transformation ist die *Antennapedia* (*Antp*)-Mutation in *Drosophila*, in der die Antenne durch ein Bein ersetzt wird (Abb. 1.5) (Schneuwly et al., 1987).

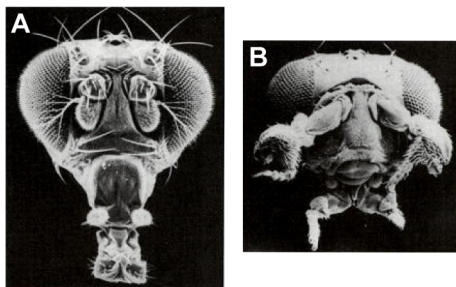


Abb. 1.5: *Antennapedia*-Mutation in *Drosophila melanogaster*. (A) Kopf von *Drosophila* Wildtyp. (B) Kopf von *Drosophila Antennapedia*-Mutante, bei der die Antenne in ein Bein umgewandelt ist. (verändert nach Kaufman et al., 1990).

Hox-Gene gehören zu der hoch konservierten Familie der Homöobox-Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl von verschiedenen Signalwegen während der Embryonalentwicklung regulieren. Während die primäre Funktion von *Hox*-Genen die Bestimmung der Identität verschiedener Körperregionen entlang der anterior-posterioren Körperachse ist, so sind *Hox*-Gene auch an der Musterbildung der Gliedmaßen sowie der Organogenese und Hämatopoese beteiligt (Krumlauf, 1994). *Hox*-Proteine besitzen eine charakteristische DNA-bindende Domäne, die aus 60 Aminosäuren besteht und als Homöodomäne bezeichnet wird. Diese Domäne besteht aus drei α -Helices und einem N-terminalen Arm, die zusammen das DNA-bindende Helix-turn-Helix-Motiv bilden. Während die Helix3 mit der großen Furche der DNA in Kontakt tritt, wird die kleine Furche durch den N-terminalen Arm besetzt. Helix1 und Helix2 liegen über der DNA (Otting et al., 1990). Da die Homöodomäne hoch konserviert ist, wird die funktionelle Spezifität des *Hox*-Proteins durch die anderen Proteindomänen verliehen (Williams et al., 2006).

1.3.1 *Hox*-Cluster in Vertebraten

Hox-Gene sind auf den Chromosomen in Clustern angeordnet. In *Drosophila* ist nur ein *Hox*-Cluster (HOM-C) zu finden, bestehend aus dem *Antennapedia*-Komplex (ANT-C) und dem *Bithorax*-Komplex (BX-C). In Säugetieren sind 39 *Hox*-Gene vorhanden, die in vier Clustern (*Hoxa-Hoxd*) auf verschiedenen Chromosomen organisiert sind (Abb. 1.6) (Krumlauf, 1994; McGinnis und Krumlauf, 1992). Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Struktur, der relativen Position auf dem Chromosom und der Expressionsmuster werden die *Hox*-Gene der Vertebraten in 13 paraloge Gruppen eingeteilt. Die *Hox*-Gene einer paralogen Gruppe besitzen demnach mehr Ähnlichkeiten untereinander als zu den Genen des gleichen Clusters. Es wird daher vermutet, dass die *Hox*-Cluster der Vertebraten durch mehrfache Duplikationsereignisse von einem ursprünglichen *Hox*-Cluster entstanden sind, aus dem sich auch das *Drosophila Hox*-Cluster entwickelt hat (Graham et al., 1989). Jedoch sind während dieser Duplikationsereignisse auch einzelne Gene innerhalb der Cluster verloren gegangen. Die Expression der einzelnen *Hox*-Gene entlang der anterior-posterioren Körperachse wird in zeitlicher und räumlicher Reihenfolge, anhand ihrer lineareren Anordnung auf dem Chromosom, reguliert. Folglich werden die 3'paralogen *Hox*-Gene früher und anterior exprimiert, während die 5'*Hox*-Gene später und posterior exprimiert werden. Die Aktivierung von *Hox*-Genen erfolgt demnach nach dem Prinzip der räumlichen und zeitlichen Kolinearität (Dolle et al., 1989; Izpisua-Belmonte et al., 1991). Da die Expression von *Hox*-Genen entlang der anterior-posterioren Körperachse auch durch einen Gradient von Retinsäure (RA) bestimmt wird, besitzen die Promotoren vieler *Hox*-Gene Bindungsstellen für den Retinsäure-Rezeptor (Langston et al., 1997). Während anteriore *Hox*-Gene sensitiv für RA sind, so werden die posterioren *Hox*-Gene kaum durch RA reguliert. Durch die Expression der verschiedenen *Hox*-Gene wird ein Code generiert, der den Zellen des Embryos positionelle Identität entlang der anterior-posterioren Achse verleiht und somit die einzelnen Bereiche des Körpers spezifiziert.

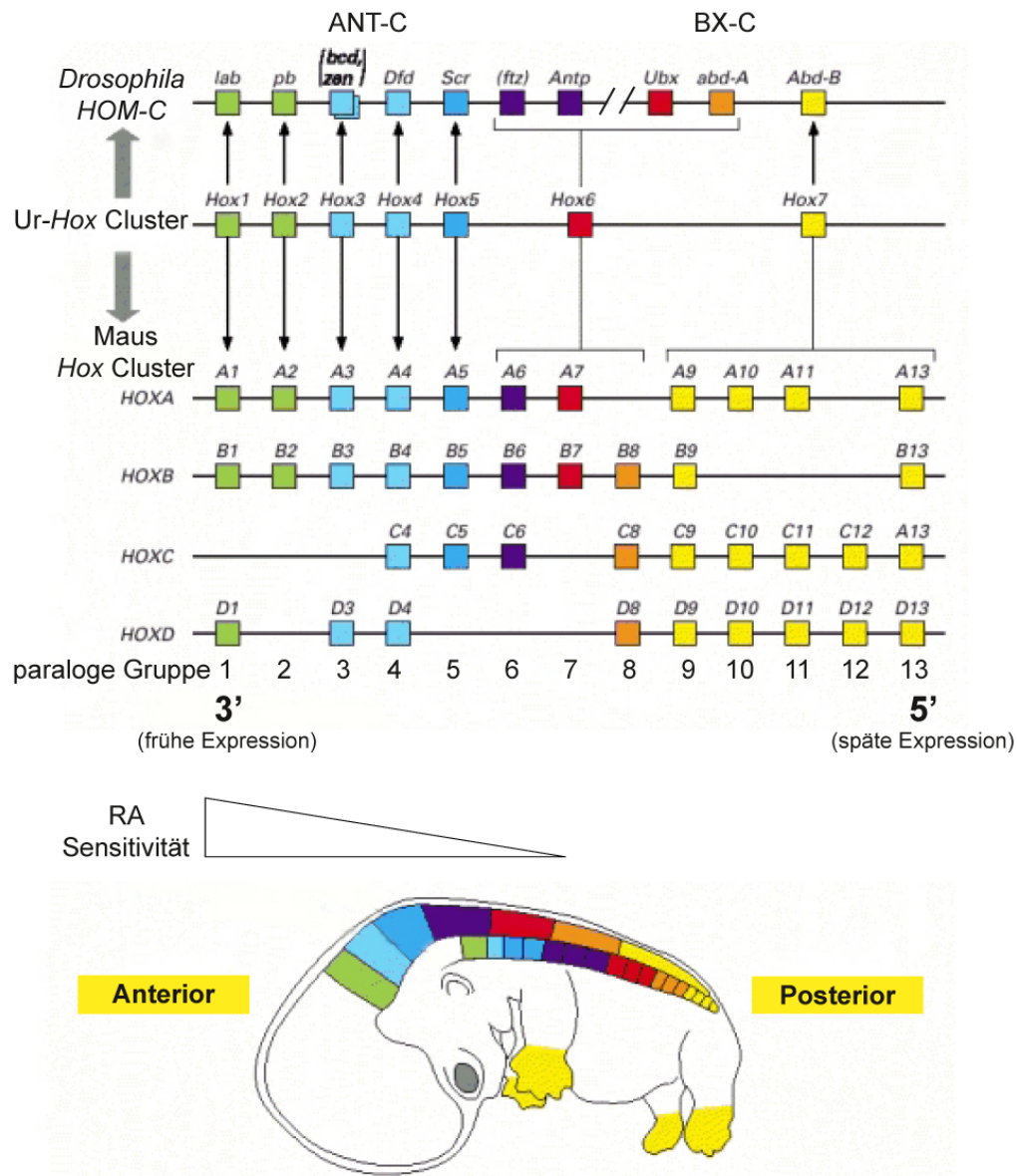


Abb. 1.6: Vergleich der Hox-Gencluster von *Drosophila* und Vertebraten. Das einzige Hox-Cluster in *Drosophila* (*HOM-C*) ist in den *Antennapedia*- (ANT-C) und *Bithorax*-Komplex (BX-C) eingeteilt. Die Hox-Gene der Maus sind dagegen in vier Clustern auf verschiedenen Chromosomen organisiert. Aufgrund von Sequenzvergleichen werden die Hox-Gene der Vertebraten in 13 paraloge Gruppen eingeteilt. Die Gene, die auf dem Chromosom in der 3'Region liegen, werden zuerst und in anterioren Regionen des Embryos exprimiert. Die 3'Hox-Gene zeigen außerdem die höchste Sensitivität für RA. Die 5'Hox-Gene werden in posterioren Regionen des Embryos exprimiert und reagieren nicht auf RA. (verändert nach Alberts et al., 2002).

1.3.2 Bedeutung und Expression der *Hox*-Gene während der Gliedmaßenentwicklung

Bei der Entwicklung der Vorderextremitäten sind vor allem die posterioren *Hox*-Gene (paraloge Gruppen 9-13) des *Hoxa*- und *Hoxd*-Clusters von Bedeutung. Die Identität eines Elements der Gliedmaßen wird durch die überlappende Expression dieser posterioren *Hoxa*- und *Hoxd*-Gene definiert. In den Vordergliedmaßen sind demnach die paralogen *Hox9*-Gene des *Hoxa*- und *Hoxd*-Clusters für die Bildung der Scapula verantwortlich. Die *Hox10*-Gene bilden den Humerus (Stylopod). *Hoxa11* und *Hoxd11* definieren die Identität von Ulna und Radius (Zeugopod). Die *Hox*-Gene der paralogen Gruppe 12 sind für die Entwicklung des Carpus und die *Hox13*-Gene für die Bildung des Metacarpus und der Phalangen (Autopod) essentiell (Abb. 1.7) (Davis et al., 1995). Mutationen in posterioren *Hox*-Genen können erhebliche Veränderungen der Gliedmaßen verursachen. Beispielsweise besitzen Mäuse, die homozygot sowohl für *Hoxa13* als auch *Hoxd13* defizient sind, keine Finger (Fromental-Ramain et al., 1996b).

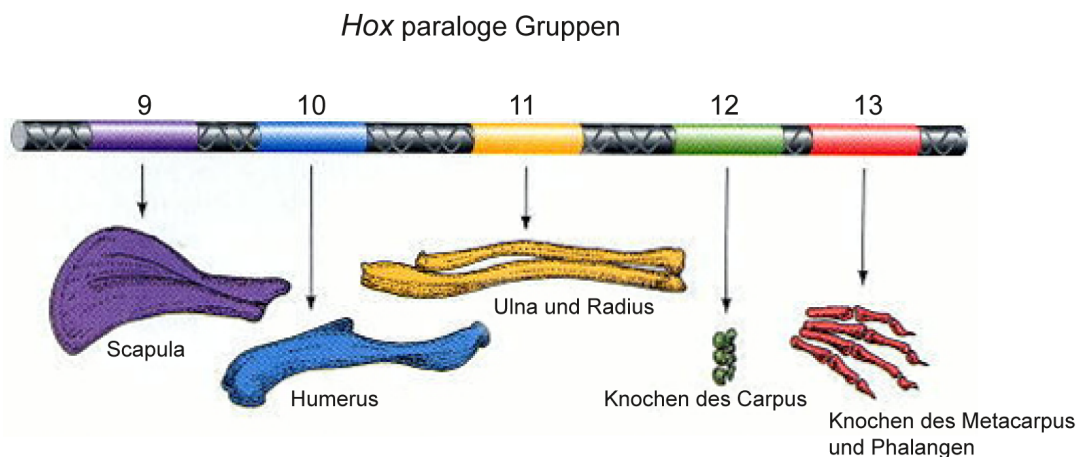


Abb. 1.7: Festlegung der Identität der einzelnen Elemente der Vordergliedmaßen durch posteriore *Hox*-Gene. Paraloge *Hox9*-Gene des *Hoxa*- und *Hoxd*-Clusters bestimmen die Identität der Scapula, während *Hox10* den Humerus, *Hox11* Ulna und Radius, *Hox12* die Knochen des Carpus und *Hox13*-Gene die Knochen des Metacarpus und die Phalangen bilden. (verändert nach Gilbert, 2003, Seite 533).

1.3.3 Regulation der Expression von *Hoxd*-Genen

Die Expression von *Hox*-Genen erfolgt, wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, nach dem Prinzip der räumlichen und zeitlichen Kolinearität. Die Anordnung der *Hox*-Gene in Clustern spielt dabei eine entscheidende Rolle. Um diese koordinierte Expression zu ermöglichen, bedarf es besonderer Regulationsmechanismen. Für die Regulation

der *Hoxd*-Genexpression während der Entwicklung der Gliedmaßen werden zwei Kontrollregionen auf beiden Seiten außerhalb des *Hoxd*-Clusters benötigt (Abb. 1.8) (Kmita et al., 2002; Spitz et al., 2003; Spitz et al., 2001; Zakany et al., 2004). Zu Beginn der Gliedmaßenentwicklung, im Embryonalstadium E9.0, werden die *Hoxd*-Gene durch die „Early Limb Control Region“ (ELCR) gesteuert (erste Phase der *Hoxd*-Genexpression). Diese Regulatorsequenz liegt in der 3'Region des *Hoxd*-Clusters und ist für die kolineare Expression verantwortlich. Der Abstand der *Hox*-Gene zur ELCR ist für die kolineare Expression von entscheidender Bedeutung. Nahe gelegene anteriore *Hox*-Gene (z.B. *Hoxd1*) werden stark und in der ganzen Gliedmaßenknospe exprimiert, während weiter entfernt liegende, posteriore *Hoxd*-Gene (z.B. *Hoxd13*) schwach und nur im posterioren Bereich der Gliedmaßenknospe exprimiert werden. Auf der anderen Seite des *Hoxd*-Clusters, im 5'Bereich, befindet sich die „Global Control Region“ (GCR), die mehrere Enhancer-Sequenzen enthält. Zu diesen Enhancern gehört der „Digit-Enhancer“, der die Expression der *Hoxd*-Gene während der zweiten Phase der *Hoxd*-Genexpression reguliert. Diese zweite Phase beginnt im Embryonalstadium E10.5 nach der Expression des Signalmoleküls *Sonic Hedgehog* (*Shh*). Der GCR-Enhancer steuert die Expression der posterioren *Hoxd*-Gene (*Hoxd10*-*Hoxd13*) in den Fingern. Jedoch erfolgt diese Regulation durch das Prinzip der reversen Kolinearität, da nun die posterioren *Hox*-Gene am stärksten exprimiert werden. Für das Expressionslevel ist wieder der Abstand vom *Hox*-Gen zum Enhancer verantwortlich. *Hoxd13* liegt am nächsten an der GCR und wird somit am stärksten in der anterioren Region der Gliedmaße exprimiert. *Hoxd10* ist dagegen am weitesten entfernt lokalisiert und wird am schwächsten exprimiert (Deschamps, 2004; Spitz et al., 2003; Zakany et al., 2004).

Mit Hilfe verschiedener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass der Abstand der *Hox*-Gene zu den Enhancern von entscheidender Bedeutung ist. Wird *Hoxd13* deletiert, so wird der Abstand zum Enhancer reduziert und *Hoxd12* gelangt an die Stelle von *Hoxd13*, wodurch es auch in der Region exprimiert wird, in der normalerweise *Hoxd13* exprimiert wird. Erfolgt eine Deletion sowohl von *Hoxd13* als auch von *Hoxd12*, so wird *Hoxd11* an deren Stelle exprimiert (Kmita et al., 2002).

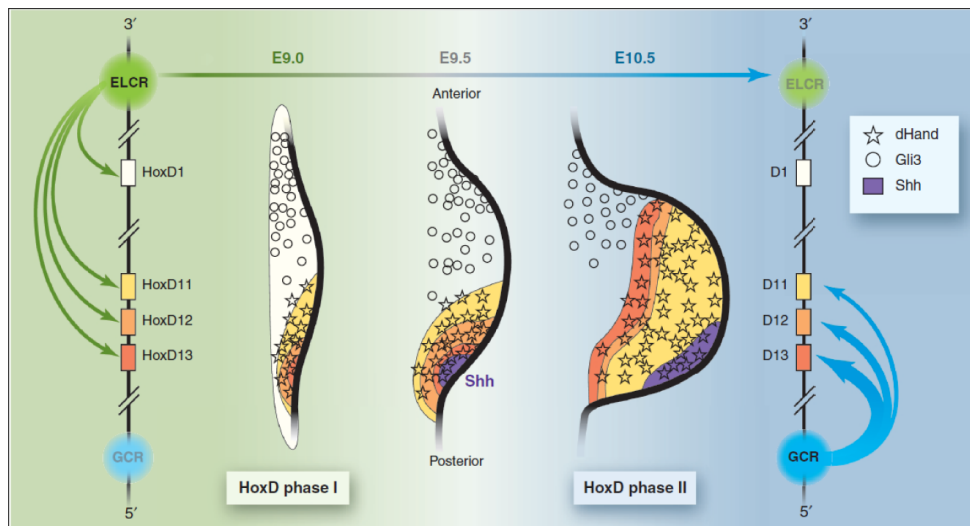


Abb. 1.8: Regulation der *Hoxd*-Genexpression während der frühen Entwicklung der Gliedmaßen. In der ersten Phase werden die *Hox*-Gene der Reihenfolge nach von *Hoxd1* bis *Hoxd13* mit abnehmendem Expressionslevel exprimiert. Reguliert wird diese Phase durch den Enhancer ELCR. Die überlappenden Expressionsdomänen werden nach und nach in posteriore Regionen verlagert. Nach Produktion von Shh wird die Expression der *Hoxd*-Gene von dem GCR-Enhancer reguliert. Durch diesen Enhancer werden die posterioren *Hox*-Gene in umgekehrter Reihenfolge (von *Hoxd13* bis *Hoxd11*) und abnehmendem Expressionsniveau in den Fingern exprimiert. *Hoxd13* zeigt dort die am weitesten anterior gelegene Expressionsdomäne. (verändert nach Deschamps, 2004).

In den letzten Jahren wurde noch ein zweiter Enhancer (*Prox*) ermittelt, der die *Hoxd*-Expression in den Fingern, zusammen mit dem GCR-Enhancer, reguliert. Dieser Enhancer liegt zwischen dem Gen *Lunapark* (*Lnp*) und *Even skipped homeotic gene 2* (*Evx2*) (Abb. 1.9) (Gonzalez et al., 2007; Montavon et al., 2008). Der Hypothese nach bilden Faktoren, die an die Enhancer GCR und *Prox* gebunden sind, einen Komplex und interagieren mit der Sequenz zwischen *Evx2* und dem *Hoxd*-Cluster. In einem weiteren Schritt wird dann die Expression der *Hoxd*-Gene aktiviert. Die Regulation der zweiten Phase der *Hoxd*-Genexpression erfolgt demnach durch die Kombination zweier Enhancer (Montavon et al., 2008).

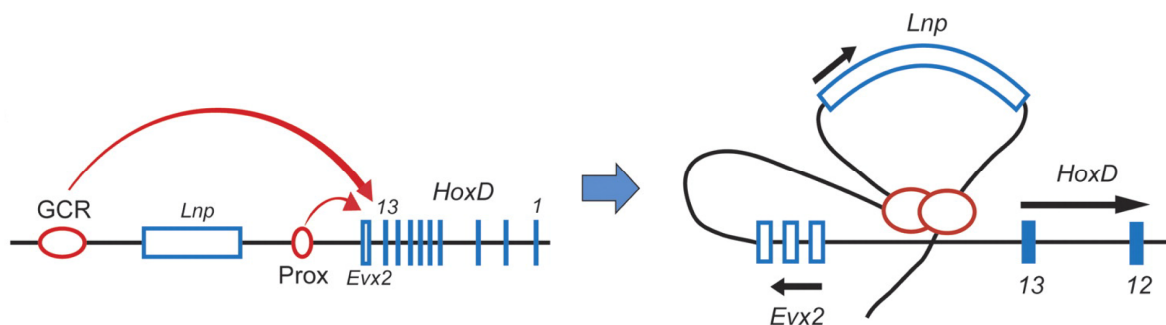


Abb. 1.9: Modell zur Regulation der *Hoxd*-Expression durch GCR und *Prox*. Die Enhancer GCR und *Prox* interagieren in der genomischen Sequenz zwischen *Evx2* und *Hoxd13*, um daraufhin die Expression der *Hoxd*-Gene zu regulieren. (verändert nach Montavon et al., 2008).

1.3.4 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mauslinie

In *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mäusen bewirkt die gezielte Inaktivierung von *Hoxa11* und *Hoxd11* den vollständigen Verlust der entsprechenden Genprodukte. Der Phänotyp der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten zeichnet sich durch eine spezifische Reduktion von Ulna und Radius aus, wodurch die Vorderextremitäten stark verkürzt sind. Des Weiteren sind die Knochen des Carpus deutlich beeinträchtigt. Diese sind teilweise fusioniert, missgebildet oder sogar überhaupt nicht vorhanden. Die Knochen des Metacarpus der Finger II, III, und V sind verkürzt und es ist eine Syndactyly der Finger I, II, III zu finden. Außerdem ist oft eine Fusion oder der Verlust einiger Phalangen zu erkennen. Der Phänotyp der Vordergliedmaßen ist abhängig von der Anzahl der mutierten Allele. In *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/-}-Vordergliedmaßen sind nur die proximalen Knochen des Carpus fusioniert. Ulna und Radius der *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/-}-Vordergliedmaßen sind dagegen nicht verändert und entsprechen denen der Wildtyp-Tiere. Das Gleiche gilt für Mutanten mit nur einem mutierten Allel (*Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/+}, *Hoxa11*^{+/+};*d11*^{+/-}). Während die Vordergliedmaßen von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mäusen erheblich verkürzt sind, so ist der Phänotyp der Hintergliedmaßen nicht so auffällig. Die Fibula (Wadenbein) ist etwas dicker und nie mit der Tibia (Schienbein) fusioniert. Auffallend ist außerdem der Verlust der proximalen Knochen des Tarsus (Fußwurzel), wodurch Tibia und Fibula an den Metatarsus (Mittelfuß) grenzen. Des Weiteren zeigen *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten auch erhebliche Veränderungen im Axialskelett. Beispielsweise sind in diesen Tieren aus zwei Kreuzwirbeln durch homöotische Transformation zwei Lendenwirbel entstanden. *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mäuse besitzen außerdem einen starken Nierendefekt, der oft perinatal letal ist (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995).

1.3.5 *Ulnaless*-Mutation der Maus

Die murine, semi-dominante *Ulnaless*-Mutation entstand durch eine Röntgen-induzierte DNA-Inversion, die die komplette *Hoxd*-Region beinhaltet (Abb. 1.10) (Davisson und Cattanaach, 1990; Morris, 1967; Peichel et al., 1996). Der centromerische Bruchpunkt des Chromosoms liegt im 5'Bereich, in dem Gen *Lnp*. Die telomerische Bruchstelle liegt ungefähr 770 kb entfernt. In Folge der Inversion ist *Hoxd13* anstelle von 200 kb, nun circa 800 kb vom GCR-Enhancer entfernt. Durch die neue Lokalisation der *Hox*-Gene ist die Regulation der *Hox*-Genexpression verändert. Aufgrund dessen werden die posterioren *Hoxd12*- und *Hoxd13*-Gene,

welche im Wildtyp im Autopod exprimiert werden, ektopisch im Zeugopod exprimiert. Nach dem derzeitigen Modell wirken *Hoxd12* und *Hoxd13* dort antagonistisch zu *Hoxa11* und *Hoxd11*, die im Wildtyp spezifisch im Zeugopod exprimiert werden, und reprimieren deren Funktion (Herault et al., 1997; Peichel et al., 1997). Die Dominanz eines posterioren *Hox*-Gens über die Funktion von anterioren *Hox*-Genen wird als posteriore Prävalenz bezeichnet (Duboule, 1991).

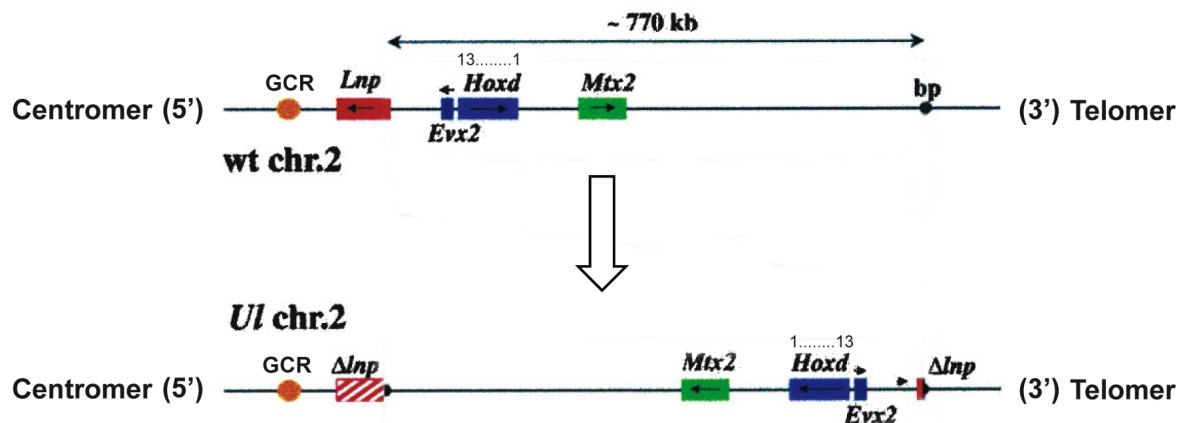


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der *Hoxd*-Region auf dem Wildtyp (wt)- und *Ulnaless* (UL)-Chromosom. Das zwischen *Lnp* und dem telomerischen Bruchpunkt (bp) liegende 770 kb Fragment wurde in *Ulnaless*-Mutanten invertiert. Als Konsequenz wurde die Sequenz von *Lnp* geteilt und die *Hox*-Gene weiter von der GCR Region entfernt. (verändert nach Spitz et al., 2003).

Heterozygote *Ulnaless*-Mäuse (*UL*/+) weisen Veränderungen der Gliedmaßen, jedoch nicht des Axialskeletts, auf. In den Vorderextremitäten liegt eine spezifische Reduktion der Größe von Ulna und Radius vor, wobei die Ulna am stärksten betroffen ist. Der Radius ist außerdem gebogen. In den Hintergliedmaßen sind geringere Missbildungen zu sehen. Die Tibia ist gebogen und zusammen mit der Fibula um 90° rotiert. Außerdem ist die Fibula leicht verkürzt und proximal von der Tibia gelöst. Des Weiteren sind die Gelenke im Carpus und Tarsus fehlgebildet, wodurch es zu einer Fehlstellung der Hände und Füße kommt (Davisson und Cattanaach, 1990; Herault et al., 1997; Peichel et al., 1997).

Aufgrund der Repression von *Hoxa11* und *Hoxd11* durch ektopisch exprimierte, posteriore *Hox*-Gene und des vergleichbaren Phänotyps der Vordergliedmaßen eignet sich die *Ulnaless*-Maus zur Analyse der Vorderextremitäten als Modell für die *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}-Mutation.

2. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, wie die positionelle Information von *Hox*-Genen in ein spezifisches Knochenmuster umgesetzt wird. Dazu sollten die Vorderextremitäten von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mäusen während der Embryonalentwicklung analysiert werden. In vorherigen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass in der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutante Ulna und Radius erheblich verkürzt sind und die Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod gestört ist (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995). Eine detaillierte Analyse blieb jedoch aus. Aufgrund dessen sollte in dieser Arbeit der Einfluss von posterioren *Hoxa*- und *Hoxd*-Genen auf die Chondrozytendifferenzierung in Vorderextremitäten der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutante untersucht werden. Da jedoch die theoretische Wahrscheinlichkeit eine *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutante zu erhalten nur 6,25% beträgt, sollten zusätzlich die Vordergliedmaßen von *Ulnaless*-Mäusen analysiert werden. Die *Ulnaless*-Maus dient aufgrund der molekularen und phänotypischen Eigenschaften als Modell für die *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutation. Da die *Ulnaless*-Mutation eine dominante Mutation ist, liegt die theoretische Wahrscheinlichkeit einen *Ulnaless*-Embryo zu erhalten bei 50%.

Ziel dieser Arbeit war, die Chondrozytendifferenzierung in den Vorderextremitäten von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten sowohl morphologisch als auch molekular zu analysieren und zu vergleichen. Mittels *in situ* Hybridisierung sollte die Expression verschiedener Markergene der Chondrozytendifferenzierung untersucht werden. Durch Veränderungen in der Expression der Chondrozytenmarker sollten Rückschlüsse auf den Effekt der *Hox*-Gene auf die Differenzierung spezifischer Chondrozytenpopulationen gezogen werden. Diese molekulare Analyse sollte außerdem zur Identifikation möglicher Zielgene führen, die durch *Hoxa11* und *Hoxd11* während der Chondrozytendifferenzierung reguliert werden. Des Weiteren sollte der Phänotyp der Vorderextremitäten auch in primären Chondrozytenkulturen und Organkulturen untersucht werden.

Bereits 2004 wurde von Boulet und Capecchi publiziert, dass *Ihh* in Ulna und Radius von E15.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten nicht exprimiert ist. Daher sollte in einem weiteren Projekt die Regulation der *Ihh*-Expression untersucht werden und der Einfluss von *Hoxa11* und *Hoxd11* auf die Expression von *Ihh* überprüft werden. Zuerst sollten regulatorische Sequenzen von *Ihh* innerhalb einer 16 kb Sequenz des 5'Bereiches von *Ihh* identifiziert werden. Für die Identifikation von *Ihh*-Enhancern

sollten verschiedene Reporter-Konstrukte kloniert werden, die sowohl für eine *in vitro* Analyse in mesenchymalen Zellen der Gliedmaßenknospe als auch für die *in vivo* Untersuchung in transgenen Mäusen verwendet werden können. Die Transfektion von mesenchymalen Zellen mit diesen Reporter-Konstrukten und verschiedenen Transkriptionsfaktoren sollte außerdem zur Identifikation von Faktoren führen, die an diese Enhancer-Fragmente binden und diese regulieren können. Des Weiteren sollten mittels eines Hefe-Ein-Hybrid Systems weitere transkriptionelle Regulatoren der *Ihh*-Expression bestimmt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die bei den verschiedenen Experimenten benutzten Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software mit der entsprechenden Bezugsquelle aufgeführt. Des Weiteren sind die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Nährmedien beschrieben und die Bakterien-, Hefe- und Mausstämme sowie Oligonukleotide, Vektoren und Sonden aufgelistet, die in dieser Arbeit benutzt wurden.

3.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Bacto-Agar	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
BM Purple AP Substrat	Roche (Mannheim)
Böhringer Blocking Reagenz	Roche (Mannheim)
Cyclopamin	Calbiochem (Darmstadt)
Difco-Pepton	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
DirectPCR-Tail	Peqlab (Erlangen)
DPX-Mounting Medium	Fluka (Deisenhofen)
Entwickler	Kodak (Stuttgart)
Fixierer	Kodak (Stuttgart)
Glycogen (20 mg/ml)	Roche (Mannheim)
Photoemulsion (NTB)	Integra Biosciences (Fernwald)
Pierce ECI Western Blot Substrate	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Yeast nitrogen base w/o amino acids	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)

3.1.2 Radiochemikalien

Das verwendete [α ³³P]-UTP wurde von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

3.1.3 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Collagenase NB 4	Serva (Heidelberg)
Dig RNA Labeling Mix	Roche (Mannheim)
Dispase (Neutral Protease)	Serva (Heidelberg)
DNase I, RNase free (10 U/μl)	Roche (Mannheim)
Dream Taq-Polymerase (5 U/μl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Long PCR Enzyme Mix (5 U/μl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lyticase	Sigma (Taufkirchen)
Proteinase K (10 mg/ml)	Roche (Mannheim)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt am Main)
RNase A (10 mg/ml)	Roche (Mannheim)
RNase Inhibitor (40 U/μl)	Roche (Mannheim)
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
T3-, T7-, SP6-Polymerase (20 U/μl)	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main)

3.1.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Actin (ab1801)	Abcam (Cambridge)
Anti-Dig-AP Fab Fragment	Roche (Mannheim)
Anti-Matrix-Metalloproteinase-3 (M5052)	Sigma (Taufkirchen)
Anti-Rabbit HRP	Dako (Hamburg)

3.1.5 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	Bezugsquelle
BAC RP23-430G15	Invitrogen (Karlsruhe)
BMP2, human (355-BM)	R&D (Wiesbaden)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
dNTPs (100 mM)	VWR (Darmstadt)
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Bio-Rad (München)
Glass Beads	Roth (Karlsruhe)
Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml)	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
in vitro fertilization dish	BD Biosciences Falcon (Heidelberg)
Metallgitter	Wire Mesh Corporation (Augusta, USA)

Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	Bezugsquelle
Nitrocellulose-Filterpapier (0,8 µm)	Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad (München)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Roth (Karlsruhe)
Paraplast-Paraffin	Roth (Karlsruhe)
Protease Inhibitor Lösung	Calbiochem (Darmstadt)
rNTPs (100 mM)	Roche (Mannheim)
Röntgenfilme	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Zellsiebe (40 µm)	BD Biosciences Falcon (Heidelberg)

3.1.6 Geräte und Software

Geräte	Hersteller
Einbettstation	Leica (Wetzlar)
Elektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen), Serva (Heidelberg)
Elektroporationsgerät (Gene Pulser)	Bio-Rad (München)
Entwicklermaschine für Filme (Curix 60)	AGFA (Leverkusen)
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS (Göttingen)
Gewebeeinbettautomat	Microm (Walldorf)
Luminometer (Centro LB 960)	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Mikroskop (Axioplan 2)	Zeiss (Göttingen)
Mikrotom	Microm (Walldorf)
MilliQ-Anlage	Millipore (Schwalbach)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen)
Nucleofector	Lonza (Köln)
PCR-Geräte (Mastercycler epgradientS)	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Geräte (Thermocycler T3000)	Biometra (Göttingen)
Stereomikroskop (MZ FLIII)	Leica (Wetzlar)
Sterilbank (HERAsafe, MSC-Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Zellkultur-Inkubatoren	Labotect (Göttingen)
Zentrifuge (5810R)	Eppendorf (Hamburg)
(Rotor F45-30-11 für Eppendorf-Gefäße, Rotor A-4-62 für Falcon-Gefäße)	
Software	Gerät
INTAS GDS	Gel-Dokumentation
MicroWin 2000, Version 4.41	Luminometer
Spot Advanced Version 4.5.7	Mikroskope

3.1.7 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden in hochreinem, deionisierten Wasser (MilliQ-Anlage) angesetzt und, sofern erforderlich, durch Autoklavieren bei 121°C für 30 min sterilisiert. Spezielle Lösungen und Puffer, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, werden bei den einzelnen Methoden entsprechend ihrer Verwendung beschrieben.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC auf 1 l H ₂ O
6x Orange G-Auftragungspuffer	300 ml/l Glycerin 2 g/l Orange G
10x PBS	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
PFA	4% (w/v) in 1x PBS
20x SSC	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl
10x TBS	80 g NaCl 2 g KCl 250 mM Tris, pH 7,5 ad 1 l H ₂ O
1x TBST	1% (v/v) Tween 20
TE	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA
TES	TE + 0,1% (w/v) SDS

Nährmedien für Bakterien

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurde Luria Bertani-(LB)-Medium oder LB-Agar verwendet. Die Lösungen wurden vor Zugabe des Antibiotikums autoklaviert. Zur Selektion der Bakterien wurde dem LB-Medium oder dem LB-Agar entweder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,0
LB-Agar	1,5% (w/v) Agar in LB-Medium
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7,0

Nährmedien für Hefe

Zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurde YPD-Medium oder YPDA-Agar-Platten verwendet. Die Selektion von transformierten Hefe-Klonen erfolgte in SD-Medium oder auf SD-Agar-Platten. Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen auf circa 55°C abgekühlt und schließlich 2% Glucose zugegeben.

Medium	Zusammensetzung
SD-Medium	6,7 g/l Yeast nitrogen base w/o amino acids
SD-Leu	0,69 g/l -Leu DO Supplement
SD-Trp	0,74 g/l -Trp DO Supplement
SD-Leu/-Trp	0,64 g/l -Leu/-Trp DO Supplement
SD-His/-Leu/-Trp	0,62 g/l -His/-Leu/-Trp DO Supplement
SD-His/-Trp	0,62 g/l -His/-Leu/-Trp DO Supplement + 1 g/l L-Leucin pH 5,8 Nach dem Autoklavieren:
SD-His/-Trp + 3-AT	+ unterschiedliche 3-AT-Konzentrationen
SD-His/-Leu/-Trp + 170 mM 3-AT	+ 170 mM 3-AT

Medium	Zusammensetzung
SD-Agar	20 g/l Bacto-Agar in SD-Medium
YPD Plus Liquid Medium	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
YPD-Medium	2% (w/v) Difco-Pepton 1% (w/v) Hefe-Extrakt pH 6,5
YPDA-Agar	2% (w/v) Bacto-Agar in YPD-Medium 0,003% Adeninhemisulfat nach dem Autoklavieren zugeben

Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien und deren Zusatzstoffe wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zusätzlich wurde FCS von PAN (Aidenbach) und Biggers Medium von MP Biomedicals (Eschwege) erworben.

3.1.8 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> , <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901,</i> <i>leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, MEL1,</i> <i>URA3::GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA}-lacZ</i>	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)

3.1.9 Mäusstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
C57BL/6J	Wildtyp	Harlan-Winkelmann (Borchen)
NMRI	Wildtyp	Harlan-Winkelmann (Borchen)
<i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-}	<i>Hoxa11</i> - und <i>Hoxd11</i> - Knockout	(Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995)
<i>Ptch-LacZ</i>	Knock-in von <i>lacZ</i> in den <i>Ptch1</i> -Lokus	The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)
<i>Ulnaless</i>	Inversion des <i>Hoxd</i> -Clusters	The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)

3.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) oder Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die zur Klonierung angehängten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind in der Oligonukleotid-Sequenz unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Intron-for	AACCGCTCGAG CAG CGC GCC ATC GAA GCA TC	Intron-pGL4.23, Intron-pGZ40
Intron-rev	AACCGCTCGAG TGT GGA GGG GAA CGA AGT TCG	
Shox2-for	TTG CAA CGT GAC GCC CTT GTC	Sonde für <i>In situ</i> Hybridisierung
Shox2-rev	GGC GCT ATC CAC TTC TCA CTG	
T1-for2	AACCGCTCGAGCGG CAG GTC CTC ACA CAT GCT AGG	T1-pGL4.23, T1-pGZ40
T1-rev3	AACCGCTCGAGCGGCCCAAGCTT TGA AGG GAC CCG CGG TTA GC	
T3-for	AACCGCTCGAGCGGCCGGAATTC TAG GAA GAG GAG AGG CTG AAG	T3-pGL4.23, T3-pGZ40
T3-rev	AACCGGAATTCCGGCCGCTCGAG AAT GTA GTT CCA TCC TCA GGA AC	

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
T5-for2	TGA GGT CAG CCA CAG TTA GAA G	T5-pGI4.23, T3-pGZ40
T5-rev2	AACCCAAGCTT GTC AGG TCA ACG TCA TTA GAG G	
Y1H-for	AACCGCTCGAGCGGCGAGCTC GCA	
	CCA GGT TAT GAA TGA CC	Y1H-pHIS2
Y1H-rev	AACCGCTCGAGCGGCGAGCTC GGA GCT GCT GCC GTC TGC G	

3.1.11 Vektoren

Zur Klonierung wurden folgende Ausgangsvektoren verwendet:

Name	Eigenschaften	Referenz
pCRII-TOPO	linearisiert mit 3'Thymidin-Überhang, Kan ^R , Amp ^R , SP6- und T7-Promotor, <i>P_{lac}</i> , <i>LacZα</i> , f1 ori, pUC ori,	Invitrogen (Karlsruhe)
pCR4-TOPO	linearisiert mit 3'Thymidin-Überhang, Kan ^R , Amp ^R , T3- und T7-Promotor, <i>P_{lac}</i> , <i>LacZα-ccdB</i> , pUC ori	Invitrogen (Karlsruhe)
pCR-Blunt-II-TOPO	linearisiert mit glatten Enden, Kan ^R , Zeocin ^R , SP6- und T7-Promotor, <i>P_{lac}</i> , <i>LacZα-ccdB</i> , pUC ori	Invitrogen (Karlsruhe)
pGL4.23	Minimalpromotor, <i>luc2</i> (Firefly), Amp ^R , SV40-poly(A)-Signal, Col E1 ori	Promega (Mannheim)
pGZ40	p-Blueskript-Derivat, humaner β-Globin-Minimalpromotor, <i>LacZ</i> , SV40-poly(A)-Signal	(Yee und Rigby, 1993)
pHIS2	Kan ^R , <i>P_{minHIS3}</i> , <i>HIS3</i> , <i>TRP1</i> , Col E1 ori, <i>CEN6/ARS4</i>	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)

Expressionsplasmide

Zur Transfektion mesenchymaler Zellen wurden die nachfolgend aufgelisteten Plasmide verwendet:

Name	Eigenschaft	Referenz
HOXA9	cDNA für humanes <i>HOXA9</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pcDNA4/TO	von Dr. Katja Schneider, Heidelberg
Hoxa11	cDNA für murines <i>Hoxa11</i> im p3XFLAG-CMV10-Vektor	(Gong et al., 2007)
Hoxd11	cDNA für murines <i>Hoxd11</i> im pTL10-Flag-Vektor	(Albrecht et al., 2004)
Runx2	cDNA für murines <i>Runx2</i> anstelle von <i>lacZ</i> im pCMV β -Vektor	(Stock et al., 2003)
SHOX	cDNA für humanes SHOX im pcDNA4/TO-Vektor	von Dr. Katja Schneider, Heidelberg
SHOX2	cDNA für humanes SHOX2a im pT-REx-DEST31-Vektor	von Dr. Katja Schneider, Heidelberg
pcDNA4/TO	CMV-Promotor, 2xTetO ₂ , BGH-Poly(A)-Signal, EM-7-Promotor, SV40-Poly(A)-Signal, Zeocin ^R , Amp ^R , f1 ori, SV40 ori, pUC ori	Invitrogen (Karlsruhe)
pHRG-TK	<i>HSV-TK</i> -Promotor, <i>hRluc</i> (Renilla), SV40-poly(A)-Signal, Amp ^R , f1 ori	Promega (Mannheim)
pTL10-FLAG	psG5-Vektor mit N-terminalem Flag-Tag, SV40-Promotor	von Dr. Jochen Hecht, Berlin
pT-REx-DEST31	CMV-Promotor, 2xTetO ₂ , 6xHis-Tag, <i>attR1</i> , <i>attR2</i> , <i>ccdB</i> , SV40-Poly(A)-Signal, T7-Promotor, Neo ^R , Cm ^R , Amp ^R , f1 ori, SV40 ori, pUC ori	Invitrogen (Karlsruhe)

Sonden für die *in situ* Hybridisierung

Zur Herstellung von antisense-RNA-Sonden der Maus wurden folgende Plasmide, Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen verwendet:

Name	Vektor	Insert	Enzym	Polymerase	Referenz
<i>Col2a1</i>	pNJ61	650 bp	<i>EcoRI</i>	T3	(Ng et al., 1993)
<i>Col2a1</i> (<i>Typ-IIA</i>)	pSOK10	129 bp	<i>HindIII</i>	SP6	(Ng et al., 1993)
<i>Fgfr1</i>	pBSK	282 bp	<i>NdeI</i>	T7	(Minina et al., 2005)
<i>Fgfr3</i>	pBSK	310 bp	<i>NdeI</i>	T7	(Minina et al., 2005)
<i>Gdf5</i>	pSK		<i>SacI</i>	T7	von Dr. R. Lauster, Berlin
<i>Hoxc11</i>	pSafyre	503 bp	<i>XhoI</i>	Sp6	(Papenbrock et al., 2000)
<i>Ihh</i>	pBSK	1,8 kb	<i>XbaI</i>	T7	(Bitgood und McMahon, 1995)
<i>Ptch1</i>	pBSK	5 kb	<i>BglII</i>	T3	(Goodrich et al., 1996)
<i>Raldh2</i>	pBSK	468 bp	<i>EcoRI</i>	T3	(Niederreither et al., 1997)
<i>Runx2</i>	pCRII	640 bp	<i>SpeI</i>	T7	(Stricker et al., 2002)
<i>Shox2</i>	pCR4	607 bp	<i>SpeI</i>	T7	diese Arbeit
<i>Sox9</i>	pBKS	255 bp	<i>HindIII</i>	T7	(Zhao et al., 1997)
<i>Ucma</i>	pBSK	417 bp	<i>NotI</i>	T3	(Tagariello et al., 2008)

3.1.12 Klonierte Plasmide

Name	Vektor	Insert	Verwendung
Intron-TOPO	pCR-Blunt-II-TOPO	1. Intron von <i>Ihh</i>	Subklonierung
Intron-pGZ40	pGZ40	1. Intron von <i>Ihh</i>	Transgene
Intron-pGL4.23	pGL4.23	1. Intron von <i>Ihh</i>	Luciferase-Assay
<i>Shox2</i> -TOPO	pCR4-TOPO	<i>Shox2</i> -Sonde	<i>In situ</i> Hybridisierung
T1-TOPO	pCRII-TOPO	T1-Fragment	Subklonierung
T1-pGZ40	pGZ40	T1-Fragment	Transgene
T1-pGL4.23	pGL4.23	T1-Fragment	Luciferase-Assay
T3-TOPO	pCRII-TOPO	T3-Fragment	Subklonierung
T3-pGZ40	pGZ40	T3-Fragment	Transgene
T3-pGL4.23	pGL4.23	T3-Fragment	Luciferase-Assay
T5-TOPO	pCR4-TOPO	T5-Fragment	Subklonierung
T5-pGZ40	pGZ40	T5-Fragment	Transgene
T5-pGL4.23	pGL4.23	T5-Fragment	Luciferase-Assay
Y1H-pHIS2	pHIS2	Y1H-Fragment	Hefe-Ein-Hybrid

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einzelsträngige DNA als Matrize zur Synthese eines Komplementärstrangs zu nutzen, um im großen Maßstab Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Mullis und Faloona, 1987). Zur Amplifikation eines DNA-Fragments wird zu der DNA-Probe eine thermostabile DNA-Polymerase, der zugehörige Puffer, die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate, sowie zwei spezifische Oligonukleotide, die komplementär zu den Enden der zu vervielfältigen DNA-Sequenz sind, hinzugefügt. Bei jedem Zyklus der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung auf 92-98°C denaturiert. Durch Abkühlung auf eine Oligonukleotid-spezifische Temperatur können die Oligonukleotide mit den 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen der zu amplifizierenden DNA hybridisieren (Annealing). Im nächsten Schritt erfolgt die Synthese des Komplementärstrangs durch die DNA-Polymerase (Elongation). Die Temperatur beträgt bei Verwendung der *Taq*-Polymerase 72°C. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts. Die zyklische Wiederholung dieser verschiedenen Temperaturveränderungen führt schließlich zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Konzentration.

Für analytische Zwecke wurde die PCR wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz (25 µl):

- 1-20 ng Plasmid oder 100 ng genomische DNA
- 0,1 µl 5'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
- 0,1 µl 3'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
- 0,2 µl dNTPs (100 mM)
- 2,5 µl 10x Dream *Taq*-Puffer
- 1,25 µl DMSO
- 0,2 µl Dream *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
- ad 25 µl H₂O

PCR-Programm:

1. Denaturierung der DNA	95°C	5 min	
2. Denaturierung der DNA	95°C	30 sec	← 35x
3. Annealing	50-58°C	20 sec	
4. Elongation	72°C	1 min	
5. Elongation	72°C	7 min	

Bei präparativen PCRs wurde der „Long PCR Enzyme Mix“ verwendet, der neben der *Taq*-Polymerase eine DNA-Polymerase mit Exonuklease-Aktivität zum Korrekturlesen enthält. Die präparative PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Reaktionsansatz (50 µl):

500 ng	BAC RP23-430G15
0,4 µl	5'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,4 µl	3'Oligonukleotid (100 pmol/µl)
0,1 µl	dNTPs (100 mM)
5,0 µl	10x Long PCR Puffer mit MgCl ₂
2,0 µl	DMSO
0,4 µl	Long PCR Enzyme Mix (5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

1. Denaturierung der DNA	94°C	5 min	
2. Denaturierung der DNA	94°C	15 sec	← 10x
3. Annealing	50-58°C	15 sec	
4. Elongation	68°C	2,5-3,5 min	
5. Denaturierung der DNA	94°C	15 sec	← 25x
6. Annealing	50-58°C	15 sec	
7. Elongation	68°C	2,5-3,5 min	
		+ 10 sec je Zyklus	
8. Elongation	68°C	7 min	

3.2.2 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurden horizontale Agarose-Gele verwendet. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde hierzu 0,7-2% (w/v) Agarose in 1x TAE (oder 1x TBE) aufgekocht bis eine klare homogene

Lösung entstand. Nach Abkühlen der Lösung auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (0,3 µg/ml) zugegeben und die Lösung in die Gelkammer mit den gewünschten Gelkammern gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in eine Elektrophorese-Kammer überführt und mit 1x TAE (oder 1x TBE) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Orange G-Auftragungspuffer versetzt. Durch das enthaltene Glycerin wurde die Diffusion der DNA-Proben aus den Gel-Taschen verhindert. Die Elektrophorese wurde bei 80-130 Volt durchgeführt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert, wurde das DNA-Bandenmuster im Gel unter UV-Bestrahlung photographisch dokumentiert.

50x TAE:

2 M Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1 l

10x TBE:

1 M Tris-Base
0,9 M Borsäure
0,01 M EDTA, pH 8,0
pH 8,0

3.2.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe eines internen Standards im Gel kann einerseits die Größe der DNA-Fragmente als auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende DNA-Standards verwendet:

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde entweder das „UltraClean 15 DNA Purification Kit“ (Dianova) oder „NucleoSpin Extract II“ (Macherey-Nagel) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell unter Gebrauch einer UV-Handlampe aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch im Nanodrop bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Absorption der aromatischen Basen der Nukleinsäuren bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=260$ nm. Durch die Ermittlung der optischen Dichte (OD_{260}) bei dieser Wellenlänge λ kann die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung berechnet werden. Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei RNA-Messungen entspricht ein OD_{260} -Wert von 1 einem RNA-Gehalt von 40 $\mu\text{g/ml}$. Da die aromatischen Aminosäuren der Proteine bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm absorbieren, wird die Reinheit der Nukleinsäuren durch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} festgestellt. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von ungefähr 1,8, während eine reine RNA-Lösung ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von circa 2,0 erhält.

3.2.6 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die palindromische DNA-Sequenzen erkennen und daraufhin die Phosphodiester-Bindungen beider DNA-Stränge hydrolytisch spalten, so dass definierte Enden entstehen. Die Restriktionsspaltung von DNA wurde gemäß Herstellerangaben in den angegebenen Puffern bei geeigneter Temperatur durchgeführt. Dabei gilt: 1 Einheit (1 U) ist die Menge an Enzym, die benötigt wird um 1 μg DNA innerhalb 1 h zu verdauen. Die Restriktionsspaltung wurde für mindestens zwei Stunden bei 37°C durchgeführt.

3.2.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Durch die Dephosphorylierung der 5'Enden von Vektoren mit Hilfe der Alkalischer Phosphatase wird eine Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden vermieden und somit eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment begünstigt. Nach der Restriktionsspaltung des Vektors und anschließender Aufreinigung aus dem Agarose-Gel wurde dieser mit 2 μl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/ μl) und 1 μl 10x Puffer in einem Reaktionsansatz von 10 μl dephosphoryliert. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Um störende Enzymaktivitäten bei der anschließenden Ligation zu vermeiden, wurde die

Alkalische Phosphatase für 15 min bei 65°C inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor war nach Abkühlen auf Raumtemperatur direkt zur Ligation einsetzbar.

3.2.8 Ligation

Bei der Ligation von zwei kompatiblen, linearen DNA-Fragmenten wird eine Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'Phosphat und einer freien 3'Hydroxylgruppe gebildet. Um eine möglichst hohe Effizienz der Ligation zu erreichen, wurden 50-200 ng dephosphorylierter Vektor und ein 3 bis 5facher molarer Überschuss des Inserts eingesetzt. Vor der Ligation wurden Vektor und Insert, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, aufgereinigt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C.

Der Ligationsansatz (20 µl) setzt sich wie folgt zusammen:

- 50-200 ng dephosphorylierter Vektor
- 3-5x molarer Überschuss Insert
- 2 µl 10x T4-Ligase Puffer
- 1 µl T4-Ligase
- ad 20 µl H₂O

3.2.9 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Bakterien

Bakterien müssen kompetent gemacht werden, um sie zur Transformation einsetzen zu können. Zur Herstellung elektrokompetenter DH10B *E. coli* Bakterien wurden 2,5 ml einer Vorkultur in 250 ml SOB-Medium für 2-3 Stunden bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nachdem eine optische Dichte (OD) von 0,7-0,8 erreicht wurde, wurden die Bakterienkulturen 5 min auf Eis geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rpm und 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml kaltem, sterilen, 10%igem Glycerol resuspendiert und dann auf 50 ml mit 10% Glycerol aufgefüllt. Es folgte wieder eine 10minütige Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C. Diese Schritte wurden wiederholt und schließlich das Bakterienpellet in 1 ml kaltem, sterilen, 10%igem Glycerol resuspendiert und auf Trockeneis aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Transformation bei -80°C.

3.2.10 Transformation von *E. coli* Bakterien durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert, so dass die Zellen DNA aus der Umgebung aufnehmen können. Vor der Elektroporation müssen die Zellen allerdings für die DNA-Aufnahme kompetent gemacht werden (Kapitel 3.2.9). Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5-1,0 µl Plasmid-DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die trockene Küvette wurde in die Pulsapparatur „Gene Pulser“ eingesetzt und ein Puls mit 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Nach dem Puls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden bis zu 300 µl auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.11 Transformation von *E. coli* Bakterien durch Hitzeschock

Bakterien, die chemisch kompetent gemacht wurden, können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert werden (Cohen et al., 1972). Hierzu wurden 50-100 µl Bakterien (Lagerung bei -80°C) auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl des Ligationsansatzes gemischt. Dieser Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann ein Hitzeschock von 90 sec bei 42°C im Thermoblock durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz für zwei weitere Minuten auf Eis gestellt. Um die Expression der plasmidkodierten Antibiotikumresistenz zu ermöglichen, wurden 250 µl LB-Medium dazugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden daraufhin auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.12 TOPO TA-Klonierung

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde das „TOPO TA-Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Das Enzym *Taq*-Polymerase fügt während der PCR ein Desoxyadenosin an die 3'Enden der doppelsträngigen DNA-Moleküle an. PCR-Produkte können dadurch direkt mit dem TOPO-Vektor ligiert werden, da dieser komplementäre 3'Desoxythymidin-Überhänge besitzt.

3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Die Minipräparation von Plasmid-DNA diente hauptsächlich analytischen Zwecken. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde hierzu in 6 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 4 ml dieser Übernachtskultur bei 4.000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Lyse der Bakterien wurden 300 µl Puffer P2 hinzugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mit 300 µl Puffer P3 für fünf Minuten auf Eis neutralisiert. Anschließend folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm und Raumtemperatur. 900 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe des 0,8fachen Volumens (=720 µl) Isopropanol und Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und RT gefällt. Das Sediment wurde zum Waschen mit 500 µl 70%igem Ethanol für weitere fünf Minuten bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das an der Luft getrocknete Plasmid-Sediment mit 30-50 µl H₂O über Nacht bei 4°C oder für 30 min bei 37°C gelöst. Für eine Restriktionsanalyse (Kapitel 3.2.6) wurden 3 µl der Plasmid-DNA-Lösung verwendet.

Die Midipräparation von Plasmid-DNA diente vor allem präparativen Zwecken und erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräparation. Hierzu wurden circa 250 µl der Übernachtskultur von der Minipräparation oder mehrere Glaskügelchen aus einem Gefrierstock in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur bei 4.000 rpm und Raumtemperatur für 10 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Daraufhin wurden 10 ml Puffer P2 zur Lyse der Bakterien hinzugegeben. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 wurde die Lösung neutralisiert. Es folgte eine 20minütige Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C. Anschließend wurde der Überstand durch einen Faltenfilter gegeben. Zu dem klaren Durchfluss wurde das 0,7fache Volumen Isopropanol gegeben und die Plasmid-DNA für 60 min bei 4.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das gefällte Plasmid-Sediment wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, indem eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm erfolgte. Das

Plasmid-Sediment wurde an der Luft getrocknet und entsprechend der Größe des Sediments in 100-300 µl H₂O über Nacht bei 4°C oder für 30 min bei 37°C gelöst.

Puffer P1:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
10 mM EDTA

Puffer P2:

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer P3:

3 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Für die Präparation der Konstrukte, die zur Herstellung transgener Embryonen verwendet wurden, wurde das „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Präparation der Luciferase-Konstrukte erfolgte mit Hilfe des „Plasmid Midi Kits“ (Qiagen) nach Herstellervorschrift.

3.2.14 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

Gesamtzelluläre RNA wurde mittels des Kits „NucleoSpin RNA II“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Die darauf folgende cDNA-Synthese wurde mit dem „SuperScript III First-Strand Synthesis System“ (Invitrogen) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

3.2.15 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei GATC (Konstanz) durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mittels NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit den Datenbank-Sequenzen verglichen.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). SDS-Polyacrylamid-Gele bestehen aus zwei Gelen, die sich im Hinblick auf pH, Ionenstärke und Porengröße unterscheiden. Die Proteine werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Das in dieser Arbeit verwendete SDS-Gel enthielt eine Acrylamid-Konzentration von 15% im Trenngel und im Sammelgel von 5%. Nach Einstellung der Acrylamid-Konzentration wurde die radikalische Polymerisation

im Trenngel durch Zugabe von APS und TEMED ausgelöst. Die Lösung wurde sofort in die Gießkammer gegossen und das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Lösung des Sammelgels mit APS und TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen und polymerisiert. Nachfolgend ist die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels beschrieben:

	5%iges Sammelgel (5 ml)	15%iges Trenngel (10 ml)
30% Acrylamid	830 µl	5 ml
1 M Tris, pH 6,8	620 µl	
1,5 M Tris, pH 8,8		2,5 ml
10% SDS	50 µl	100 µl
H ₂ O	3,5 ml	2,4 ml
10% APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Zur Probenvorbereitung wurden die Protein-Extrakte aus der Hefe (Kapitel 3.4.5) 5-10 min bei 100°C reduziert. Die polymerisierten SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mit 1x Elektrophorese-Puffer überschichtet und 70 µl der vorbereiteten Proben auf das Gel aufgetragen. Als Proteinmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 150 V.

10x Elektrophorese-Puffer

250 mM Tris, pH 8,3

2 M Glycin

1% SDS

3.3.2 Western Blot

Unter einem Western Blot versteht man die spezifische Detektion von Proteinen mit Antikörpern nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE (Kapitel 3.3.1). In dieser Arbeit wurden die Proteine nach der SDS-PAGE über Nacht bei 10 V in Blotting-Puffer auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt und dann zunächst mit Wasser entfärbt, bis nur noch die Proteine sichtbar waren. Die vollständige Entfärbung erfolgte mit 1x TBST. Danach wurden freie Bindungsstellen der Membran und unspezifische Protein-Bindungsstellen durch 30minütige Inkubation der Membran bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) Milchpulver oder 5% BSA in 1x TBST (0,1% Tween)

blockiert. Die spezifische Detektion der nachzuweisenden Proteine erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C mit den Antikörpern gegen das jeweilige Protein. Im Folgenden ist aufgelistet, wie diese Primär-Antikörper verdünnt wurden:

Primär-Antikörper	Verdünnung
Anti-Actin	1:500 mit 5% BSA in 1x TBST (0,1% Tween)
Anti-Matrix-Metalloproteinase-3	1:500 und 1:1000 mit 5% Milchpulver in 1x TBST (0,05% Tween)

Nach Inkubation mit den Primär-Antikörpern wurde die Membran 15 min in 1x TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion der gebundenen Primär-Antikörper erfolgte durch einstündige Inkubation der Membran bei RT mit einem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper, der 1:300 mit 1% BSA in 1x TBS verdünnt wurde. Danach wurde die Membran 15 Minuten in TBS gewaschen und die Chemolumineszenz-Reaktion mit dem „Pierce ECL Western Blot Substrate“ ausgelöst. Der aufgelegte Film wurde je nach Signalstärke entwickelt.

Blotting-Puffer:

50 mM Borsäure, pH 8,5

10% Methanol

3.4 Hefe-Kultur

3.4.1 Herstellung kompetenter Hefe nach der Lithiumacetat-Methode

Zur Herstellung kompetenter Hefe wurde eine Vorkultur mit 2-3 frischen Hefe-Kolonien von einer YPDA-Platte in 50 ml YPD-Medium angesetzt. Diese wurde nach ausführlichem Vortexen über Nacht bei 30°C und 250 rpm bis zur stationären Phase mit einem OD₆₀₀-Wert größer 1,5 inkubiert. Am folgenden Tag wurden 30 ml dieser Vorkultur in 300 ml YPD-Medium gegeben, um einen OD₆₀₀-Wert von 0,2-0,3 zu erhalten. Anschließend wurde diese Hefe-Kultur für 3 h bei 30°C und 230 rpm bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,4-0,6 inkubiert. Daraufhin wurde die Hefe 5 min bei RT und 1.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in sterilem H₂O aufgenommen und erneut 5 min bei 1.000x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1,5 ml 1,1x TE/LiAc-Lösung gewaschen und in frischen 1,5 ml 1,1x TE/LiAc-Lösung resuspendiert. Die kompetente Hefe war direkt zur Transformation einsetzbar.

1,1x TE/LiAc-Lösung:

1,1 ml 10x TE

1,1 ml 1 M LiAc

ad 10 ml H₂O**3.4.2 Hefe-Ein-Hybrid System**

Das Hefe-Ein-Hybrid System bietet die Möglichkeit Proteine zu identifizieren, die an cis-regulatorische DNA-Sequenzen eines Gens binden und dadurch die Transkription dieses Gens beeinflussen (Li und Herskowitz, 1993). Das Hefe-Ein-Hybrid System basiert auf dem Prinzip, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren eine transkriptionsaktivierende und eine DNA-bindende Domäne besitzen, die strukturell und funktionell verschieden sind. Im Hefe-Ein-Hybrid System werden potentielle DNA-bindende Proteine aus einer cDNA-Bibliothek mit einer ubiquitären GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Des Weiteren wird die cis-regulatorische DNA-Zielsequenz in einen Vektor mit Reporter gen kloniert. Bei Kotransformation dieser beiden Plasmide in die Hefe und einer Bindung des GAL4-Fusionsproteins an die Zielsequenz wird das Reportergen aktiviert und die transformierte Hefe kann auf dem Selektionsmedium wachsen (Abb. 3.1).

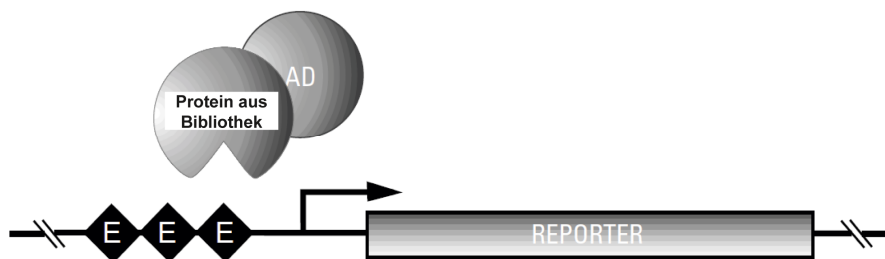


Abb. 3.1: Prinzip des Hefe-Ein-Hybrid Systems. Die von der cDNA-Bibliothek kodierten Proteine sind mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Erfolgt eine Bindung an eine regulatorische Sequenz (E), so wird die Expression des Reportergens aktiviert. (modifiziert nach dem Handbuch von BD Biosciences Clontech).

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die an die regulatorische Sequenz Y1H des *lhh*-Promotors binden, wurde zunächst das Y1H-Fragment in den pHIS2-Vektor vor einen Minimalpromotor (P_{minHIS3}) und ein *HIS3*-Reportergen kloniert. Zusätzlich enthält der pHIS2-Vektor das Selektionsgen *TRP1*, das ein Enzym des Tryptophan-Biosynthesewegs kodiert (Abb. 3.2).

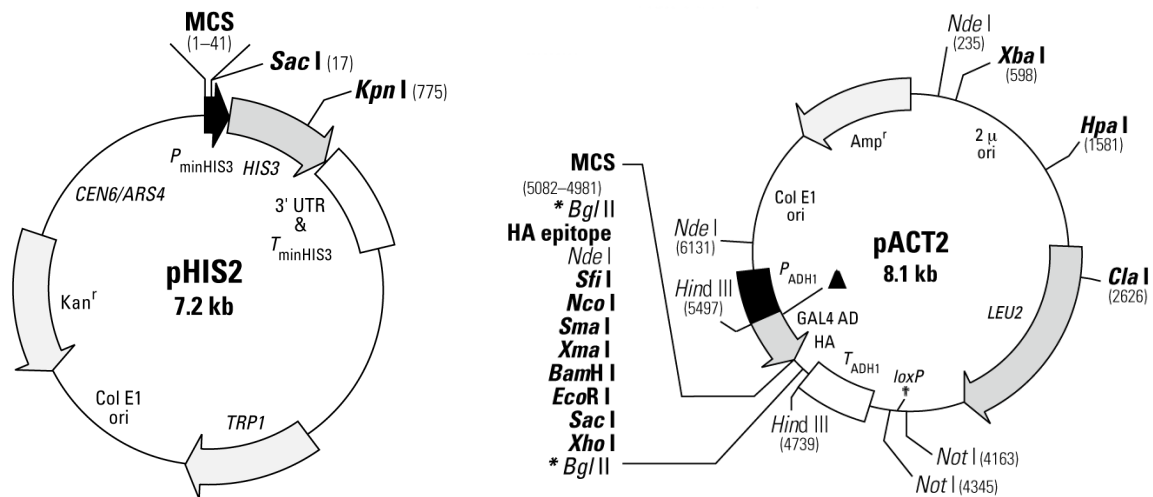


Abb. 3.2: Karten der im Hefe-Ein-Hybrid System verwendeten Vektoren.
Links: Klonierungsvektor pHis2 (BD Biosciences Clontech), der einen Minimalpromotor ($P_{minHIS3}$), ein *HIS3*-Reportergen und das Selektionsgen *TRP1* enthält. **Rechts:** pACT2-Vektor (BD Biosciences Clontech), der die cDNA-Bibliothek aus humanen Chondrozyten und das Selektionsgen *Leu2* trägt.

Das Hefe-Ein-Hybrid System wurde mit dem „Matchmaker Library Construction & Screening Kit“ (BD Biosciences Clontech) durchgeführt. Zunächst wurden 75 µl Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml) bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µg der cDNA-Bibliothek aus humanen Chondrozyten, die im pACT2-Vektor ist (Abb. 3.2; zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Kaiser, Lübeck), wurden 20 µg Y1H-pHis2-Vektor und 1,2 ml kompetente Hefe des Hefestamms Y187 zugefügt und kurz gemischt. Danach wurden 5 ml PEG/LiAc-Lösung dazu pipettiert, gemischt und 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 320 µl DMSO und ein Hitzeschock für 20 Minuten bei 42°C. Nach 2minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Hefe-Zellen bei 700x g und RT pelletiert und in 6 ml YPD Plus Liquid Medium resuspendiert. Nach einer 90minütigen Inkubation bei 30°C und 265 rpm wurden die Hefe-Zellen bei 700x g und RT pelletiert, in 6 ml 0,9% (w/v) NaCl resuspendiert und auf dem Selektionsmedium SD-His/-Leu/-Trp + 170 mM 3-AT ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für vier Tage.

PEG/LiAc-Lösung (10 ml):

- 8 ml 50% PEG 3350
- 1 ml 10x TE
- 1 ml 1 M LiAc

3.4.3 Kolonie-PCR von Hefe-Klonen

Die Kolonie-PCR wurde nach dem Standard-PCR-Protokoll (Kapitel 3.2.1) durchgeführt. Jedoch wurde als Ausgangsmaterial nicht DNA, sondern Einzelkolonien der Hefe eingesetzt. Außerdem wurde die Elongationszeit auf drei Minuten und die Annealing-Temperatur auf 65°C heraufgesetzt. Die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen sind nachfolgend aufgelistet:

Name	Sequenz (5'-3')
5'Amplimer	CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC
3'Amplimer	GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG AT

3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einzelnen, transformierten Hefe-Klonen wurden Flüssigkulturen mit dem Selektionsmedium SD-His/-Leu/-Trp + 170 mM 3-AT angesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C und 250 rpm wurden die Hefe-Zellen fünf Minuten bei 14.000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Nach Abgießen des Überstands wurde die Hefe in dem restlichen Volumen resuspendiert. Die Zellwand wurde daraufhin durch 50 U Lyticase für 1 h bei 37°C und 250 rpm verdaut. Schließlich wurden 10 µl 10% (w/v) SDS hinzugegeben und die Suspension für eine Minute auf einem Vortexer geschüttelt. Danach wurden die Proben bei -20°C eingefroren, aufgetaut und erneut gemischt. Das Volumen der Proben wurde mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt, 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und fünf Minuten mit dem Vortexer gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000rpm und RT. Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 8 µl 10 M Ammonium-Acetat und 500 µl 100% Ethanol für 1 h bei -80°C gefällt. Abschließend folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14.000 rpm. Das erhaltene Plasmid-Pellet wurde getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

3.4.5 Protein-Extraktion aus Hefe nach der Ureas/SDS-Methode

Mit einer 5 ml Übernachtskultur einzelner Hefe-Klone, die in entsprechendem Selektionsmedium angezogen wurden, wurden 50 ml YPD Medium angeimpft. Diese Kulturen wurden anschließend bei 30°C und 230 rpm geschüttelt, bis ein

OD₆₀₀-Wert von 0,4-0,6 erreicht war. Der absolute OD₆₀₀-Wert wurde durch Multiplikation des ermittelten OD₆₀₀-Werts mit dem Kulturvolumen errechnet. Die Kultur eines Hefe-Klons wurde anschließend zum Abkühlen in zwei 50 ml Falcon-Gefäße überführt, die zur Hälfte mit Eis gefüllt waren. Es folgte eine 5minütige Zentrifugation bei 1.000x g und 4°C. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut bei 1.000x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das gefrorene Hefe-Pellet wurde nun mit 100 µl 60°C warmen Cracking Puffer pro 7,5 Einheiten des absoluten OD₆₀₀-Werts resuspendiert, aufgetaut und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, das mit 80 µl Glass Beads pro 7,5 Einheiten des absoluten OD₆₀₀-Werts gefüllt war. Die Proben wurden dann bei 70°C für 10 Minuten zur Freisetzung der Membranproteine erhitzt. Nach anschließendem, 1minütigen Vortexen wurden die Proben für fünf Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Danach erfolgte die Überführung des Überstandes in ein frisches Eppendorf-Gefäß und dessen Lagerung auf Eis. Das Pellet dagegen wurde in einem 100°C heißen Wasserbad für 3-5 min gekocht und danach eine Minute gevortext. Im Anschluss daran wurden die Zelltrümmer für fünf Minuten bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Dieser Überstand wurde mit dem auf Eis lagernden Überstand vereinigt. Diese Probe wurde kurz aufgekocht und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Cracking Puffer-Stock-Lösung:

8 M Urea
5% (w/v) SDS
40 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1 mM EDTA
0,4 mg/ml Bromphenolblau

100x PMSF-Lösung:

0,1742 g PMSF in 10 ml Isopropanol

Cracking Puffer:

1 ml Cracking Puffer-Stock-Lösung
10 µl β-Mercaptoethanol
70 µl Protease Inhibitor Lösung
50 µl 100x PMSF-Lösung
(+ 1 µl 100x PMSF pro 100 µl Cracking
Puffer nach 15 min, dann alle 7 min)

3.5 Tierexperimenteller Ansatz

3.5.1 Tierversuche

Die Tierhaltung und -zucht erfolgte sowohl im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen als auch in der Maushaltung an der Universität Duisburg-Essen im Rahmen der gentechnologischen und tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

Zur Zucht von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Mausmutanten wurden folgende Verpaarungen angesetzt:

Zucht	Weibchen	Männchen
<i>Hoxa11</i> ^{-/-} ; <i>d11</i> ^{-/-}	2x <i>Hoxa11</i> ^{+/-} ; <i>d11</i> ^{-/-}	1x <i>Hoxa11</i> ^{+/-} ; <i>d11</i> ^{+/-}
<i>Ulnaless</i>	1x <i>UL</i> /+	1x Wildtyp aus <i>Ulnaless</i> -Wurf

Zur Gewinnung von mutanten Embryonen eines spezifischen Stadiums wurde ein heterozygoten *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/-}-Weibchen mit einem heterozygoten *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/-}-Männchen über Nacht verpaart. *Ulnaless*-Mäuse wurden hierfür wie bei der Zucht verpaart (s. o.). Konnte am nächsten Tag ein Vaginalplug festgestellt werden, wurde dieser Tag als Embryonalstadium E0.5 festgelegt. Befanden sich die Embryonen im gewünschten Stadium, so wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen.

Bei der Analyse der Vorderextremitäten von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten wurden die Vordergliedmaßen von *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{+/-}-, *Hoxa11*^{+/-};*d11*^{-/-}- oder *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{+/-}-Mäusen als Kontrolle verwendet. Da deren Phänotypen mit dem des Wildtyps vergleichbar sind, werden diese Gliedmaßen im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit dem Wildtyp gleichgesetzt.

3.5.2 Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA aus Schwanzspitzen mit Hilfe des „DirectPCR-Tail“-Reagenz gewonnen. Dazu wurde das Gewebe mit 200 µl des Reagenz und 0,25 mg/ml Proteinase K versetzt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K durch Inkubation bei 85°C für 45 min inaktiviert. Die genomische DNA war sofort zur PCR einsetzbar.

Die Genotypisierungs-PCRs wurden nach dem Protokoll für analytische PCRs (Kapitel 3.2.1) durchgeführt. Nachfolgend sind die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen und Annealing-Temperaturen aufgelistet:

Name	Sequenzen (5'-3')	Annealing
HoxA5'	GCT GGC TTT TAT CTG AAG CCG G	55°C
HoxA3'	CTC CCA ATT CCA GTA GGC TGG	55°C
HoxA Neo	GGT TGT TCA GAC TAC AAT CTG ACC	55°C
HoxD5'	CCT TTT TCC TAT CTC AGT GCC AG	55°C
HoxD3'	GGG GTA CAT CCT GGA GTT CTC A	55°C
HoxD Neo	TTC AAG CCC AAG CTT TCG CGA G	55°C
UL-for	ACC CTT GGA CTA AAG ACC AAA	50°C
wt-for	TTA AAG GCC ATA TGT GGA GAA G	50°C
UL/wt-rev	TTG CTG TAA ACT CAT CAG GAA G	50°C
Ptch-LacZ for	GCA AAG ACC TCG GGA CTC AC	58°C
Ptch-LacZ rev	CCG TAA TGG GAT AGG TCA CG	58°C

Im Folgenden sind für jede PCR die zu verwendeten Oligonukleotide sowie die Größe der zu erwartenden Banden aufgelistet:

Mauslinie	PCR	Oligonukleotide	Größe der Banden
<i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i>	<i>Hoxa11</i>	HoxA5', HoxA3', HoxA Neo	Wildtyp= 460 bp Mutant= 300 bp
<i>Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}</i>	<i>Hoxd11</i>	HoxD5', HoxD3', HoxD Neo	Wildtyp= 515 bp Mutant= 380 bp
<i>Ulnaless</i>	Wildtyp	wt-for, UL/wt-rev	670 bp
<i>Ulnaless</i>	Mutant	UL-for, UL/wt-rev	345 bp
<i>Ptch-LacZ</i>	Mutant	Ptch-Lacz for, Ptch-LacZ rev	600 bp

3.5.3 Generierung transgener Mausembryonen

Zur Generierung transgener Embryonen wurden zunächst die Sequenzen der putativen *Ihh*-Enhancer (Intron, T1, T3, T5) in den pGZ40-Vektor kloniert, der einen humanen β -Globin-Minimalpromotor, ein *lacZ*-Reportergen, das eine β -Galaktosidase kodiert, sowie ein SV40-Polyadenylierungssignal enthält (Abb. 3.3) (Yee und Rigby, 1993). Diese Enhancer-pGZ40-Konstrukte wurden aus den Plasmiden ausgeschnitten und durch Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus von einzelligen, befruchteten Maus-Oozyten injiziert. Diese Oozyten wurden

daraufhin in scheinschwangere Weibchen transferiert (Hogan et al., 1986). Die transgenen Maus-Embryonen wurden von Dr. Ralph Waldschütz und Wojtek Wegrzyn am Universitätsklinikum Essen generiert.



Abb. 3.3: Schematische Darstellung des pGZ40-Vektors. Der circa 6,5 kb pGZ40-Vektor enthält eine *multiple cloning site* (MCS), einen humanen β -Globin Minimalpromotor, ein *lacZ*-Reportergen und ein SV40-Polyadenylierungssignal.

3.5.4 Genotypisierung transgener Embryonen

Die transgenen Maus-Embryonen wurden im Stadium E14.5 präpariert und nach dem Standard-PCR-Protokoll (Kapitel 3.2.1) auf Anwesenheit des gesamten Enhancer-pGZ40-Konstrukts genotypisiert. Dazu wurden folgende Oligonukleotide bei einer Annealing-Temperatur von 57°C verwendet:

Name	Sequenz (5'-3')
for1-min	TAA AAG TCA GGG CAG AGC CAT C
rev1-lacZ	AAT AAT TCG CGT CTG GCC TTC C
for2-lacZ	ACA GCA ACT GAT GGA AAC CAG C
rev2-SV40	GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG CA

Die PCR mit den Oligonukleotiden for1-min und rev1-lacZ ergab eine Bande für das transgene Allel von 503 bp, während durch for2-lacZ und rev2-SV40 ein 545 bp großes PCR-Produkt resultierte.

3.6 Histologie

3.6.1 Einbettung von Gliedmaßen der Maus in Paraffin

Nach der Präparation der Extremitäten wurden diese in 4% PFA über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler fixiert. Die Fixierung von P6 Gliedmaßen wurde für zwei Tage in 4% PFA bei 4°C durchgeführt. Vor der Fixierung wurden bei E18.5 und P6 Gliedmaßen die Haut und der überwiegende Teil des Muskels entfernt. Nach der Fixierung wurden die Gliedmaßen im Gewebereinbettungsautomaten dehydriert und mit Paraffin durchtränkt. Je nach Embryonalstadium, wurden unterschiedliche Zeiten der verschiedenen Schritte für die Dehydrierung gewählt (Tab. 1). Nachdem die

Gliedmaßen mit Paraffin durchtränkt waren, wurden die Gliedmaßen in flüssigem Paraffin ausgerichtet und auf einer Kühlplatte in Paraffin-Blöcke eingebettet. Bis zum Schneiden der in Paraffin gegossenen Gliedmaßen am Mikrotom, wurden die Paraffin-Blöcke bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 1: Programme zum Einbetten von Extremitäten unterschiedlicher Stadien.

	E14.5 und E16.5	E18.5 und P6
70% Ethanol	10 min	1,5 h
80% Ethanol	10 min	1,5 h
95% Ethanol	10 min	1,5 h
100% Ethanol	10 min	1,5 h
100% Ethanol	10 min	1,5 h
100% Ethanol	10 min	1 h
Xylol	20 min	30 min
Xylol	30 min	30 min
Paraffin	1 h	30 min
Paraffin	1 h	1 h
Paraffin	1 h	1 h

3.6.2 Anfertigung von Schnitten der Gliedmaßen am Mikrotom

Am Mikrotom wurden 5-6 µm Gliedmaßenschnitte angefertigt, die zum Ausbreiten in 10% Ethanol gelegt wurden. Danach wurden diese auf Objektträger aufgezogen und auf einer 60°C Heizplatte fixiert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

3.6.3 Safranin-Weigert-Färbung

Bei der Safranin-Weigert-Färbung wird Knorpel durch Safranin O rot, der Nukleus mit Weigerts Hämatoxylin blau-schwarz und das Zytoplasma durch Fast Green grün angefärbt. Zuerst wurden die auf Objektträger gezogenen Gliedmaßenschnitte erneut bei 60°C erwärmt. Danach wurden die Schnitte für dreimal 5 min in Xylol deparaffinisiert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 3 min in zweimal 100%, 95%, 75% Ethanol und schließlich drei Minuten in bidest. H₂O. Rehydrierte Schnitte wurden 10 min in Weigerts gefärbt, in Leitungswasser gewaschen und zwei Minuten in Scott's Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen in Leitungswasser wurden die Gliedmaßenschnitte in

0,1% Fast Green gefärbt und in 1% Eisessig sowie zweimal in Leitungswasser gespült. Danach wurden die Gliedmaßenschnitte für fünf Minuten mit 0,1% Safranin O gefärbt. Zur Dehydrierung folgten eine aufsteigende Ethanolreihe (75%, 95%, zweimal 100% Ethanol) und drei Inkubationen für fünf Minuten in Xylol. Schließlich wurden die gefärbten Gliedmaßenschnitte in DPX-Mounting Medium eingedeckelt.

0,1% Fast Green:

in 10% Eisessig und 30% Ethanol

0,1% Safranin O:

in H₂O

Scott's Puffer:

10 g/l MgSO₄

2 g/l NaHCO₃

Weigerts:

Weigerts Hämatoxylinlösung A und B,

1:1 mischen

3.6.4 Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung beruht auf dem Austausch der Kalzium-Ionen in der mineralisierten, extrazellulären Matrix des Knochengewebes durch Silber-Ionen, die durch UV-Bestrahlung zu elementarem Silber reduziert werden. Dadurch kommt es zur Schwärzung der kalzifizierten Regionen im Gewebe. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot, beruht auf der Bildung eines Farblacks mit Aluminiumsulfat, der die Kerne leuchtend rot färbt. Zur Färbung der Gliedmaßenschnitte wurden diese zuerst auf einer 60°C Heizplatte erwärmt und für zweimal 10 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Die Schnitte wurden anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe für zweimal 5 min in 100% Ethanol, 5 min 95%, 5 min 75%, 1 min 50%, 1 min 30% Ethanol und 2x 1 min in H₂O rehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte in einer Glasküvette für 2-10 min in 1% Silbernitratlösung unter UV-Licht bestrahlt. Durch die Bestrahlung erfolgt eine Reduktion zu metallischem Silber, was in einer Schwarzfärbung resultiert. Nicht-reduziertes Silber wurde durch Inkubation der Gliedmaßenschnitte in 5% Natriumthiosulfat entfernt. Nach mehrfachen Waschens in Leitungswasser und bidest. H₂O wurden die Schnitte für fünf Minuten in Kernechtrot als Hintergrundfärbung gefärbt. Abschließend wurden die gefärbten Gliedmaßenschnitte in Leitungswasser gewaschen und mit erwärmter Kaisers Gelatine eingedeckelt.

3.6.5 Färbung des Skeletts mit Alcianblau/Alizarinrot

Skelettpräparationen können mit einer Alcianblau/Alizarinrot-Färbelösung angefärbt werden, wobei Alcianblau die Glykosaminoglykane des Knorpels blau und Alizarinrot Kalzium-Verbindungen in mineralisierten Geweben und Knochen rot färbt. Bei P0 und P1 Embryonen wurden zunächst die Haut und die inneren Organe entfernt. Zur Fixierung wurden die Embryonen für drei Tage in 95% Ethanol gelagert. Daraufhin wurden die Embryonen einen Tag in Aceton inkubiert. Nach Waschen in 95% Ethanol wurden die Embryonen für einen Tag in Alcianblau-Lösung gefärbt. Die Inkubationsdauer variierte jedoch je nach erzieltm Färbeergebnis. Danach wurden die Embryonen einen Tag in 95% Ethanol gewaschen. Daraufhin wurden die Alcianblau-gefärbten Embryonen mittels 1% Kaliumhydroxid für 2-6 h geklärt. Der Knochen wurde dann über Nacht bei 4°C mit Alizarinrot angefärbt. Zur Aufhellung der Embryonen wurden diese in einer aufsteigenden Glycerolreihe (20%, 40%, 60%, 80% in 1% KOH) bis zu 100% Glycerol solange aufgeklärt bis die Muskulatur transparent erschien.

Alcianblau-Färbelösung (100 ml):

15 mg Alcianblau 8 GX
80 ml 95% Ethanol
20 ml Eisessig

Alizarinrot-Färbelösung:

50 mg/l Alizarinrot in 1% KOH

3.6.6 X-Gal-Färbung von transgenen Embryonen

Die transgenen Mausembryonen wurden im Stadium E14.5 präpariert und in eiskaltem 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Embryonen 90 min in Fixierlösung auf Eis inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min in Waschlösung bei 4°C und leichtem Schütteln gewaschen. Nach Zugabe der Färbelösung erfolgte die Inkubation der Embryonen über Nacht im Dunkeln bei 37°C. Die Färbelösung enthält 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal), welches durch das *lacZ*-kodierte Enzym β -Galaktosidase und anschließender Dimerisierung und Oxidation in den unlöslichen, blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo umgesetzt wird. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgenommen und die Embryonen in 1x PBS fotografiert.

<u>Fixierlösung:</u>	<u>Waschlösung:</u>	<u>Färbelösung:</u>
1% PFA	2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
0,2% Glutaraldehyd	0,01% Natriumdeoxycholat	0,01% Natriumdeoxycholat
2 mM MgCl ₂	0,02% NP40	0,02% NP40
5 mM EGTA	in 1x PBS	5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x 3H ₂ O
in 1x PBS		5 mM K ₃ Fe(CN) ₆
		in 1x PBS
		filtrieren mit 0,45 µm Filter
		Zugabe von 1 mg/ml X-Gal

3.7 *In situ* Hybridisierung

3.7.1 Radioaktive *in situ* Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten

Diese Methode dient dem spezifischen Nachweis von mRNA eines bestimmten Gens in Geweben oder Zellen. Dazu wird eine markierte antisense-Sonde benötigt, die die komplementäre Sequenz der nachzuweisenden mRNA trägt.

Herstellung von radioaktiv-markierten RNA-Sonden

Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde zunächst die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert (Kapitel 3.1.11 und 3.2.6) und durch zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde die Probe 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Daraufhin wurde das aufgereinigte, linearisierte Plasmid mit dem 0,1fachen Volumen 3 M Natrium-Acetat und 2,5fachen Volumen 100% Ethanol bei -20°C und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert. Abschließend wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in H₂O gelöst. Von dieser aufgereinigten, linearisierten DNA wurde durch *in vitro* Transkription mit entsprechender RNA-Polymerase (Kapitel 3.1.11) eine antisense-Sonde hergestellt.

Die Reaktion wurde für 90 min bei 37°C wie folgt durchgeführt:

500 ng linearisierte DNA
 2 µl 10x Transkriptionspuffer
 2 µl rNTP-Mix (5 mM)
 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
 2 µl RNA-Polymerase (SP6, T7, T3)
 80 µCi [P^{33}]-UTP
 ad 20 µl DEPC-H₂O

Um die DNA aus den DNA-RNA-Hybriden zu entfernen und einzelsträngige RNA-Sonden zu erhalten, wurden 20 U DNase zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Transkriptionsmix wurde auf 100 µl mit DEPC-H₂O verdünnt und mit 200 ng/µl Glycogen versetzt. Die transkribierte, radioaktiv-markierte RNA wurde mit dem 0,1fachen Volumen 4 M LiCl und 2,5fachen Volumen 100% Ethanol bei -20° für 60 min präzipitiert und anschließend 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen, getrocknet, in 50 µl TES resuspendiert und 1:20 in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die antisense-Sonde wurde fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis bis zum Gebrauch abgekühlt.

50x Denhardt's Reagenz:

100 g/l Ficoll
 10 g/l Polyvinylpyrrolidone
 10 g/l BSA

Hybridisierungspuffer:

50% Formamid (deionisiert)
 3 M NaCl
 20 mM Tris, pH 7,4
 5 mM EDTA, pH 8,0
 10 mM NaH₂PO₄, pH 8,0
 10% (w/v) Dextransulfat
 1x Denhardts
 0,5 mg/ml Hefe-RNA

Prähybridisierung und *in situ* Hybridisierung

Für alle Prähybridisierungs-Lösungen wurde RNase-freies Wasser verwendet. Zunächst wurden die Paraffin-Schnitte der Gliedmaßen für zweimal 10 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils zwei Minuten pro Lösung in einer absteigenden Ethanolreihe in zweimal 100%, 95%, 75%, 50% und 30% Ethanol rehydriert, fünf Minuten in 0,85% NaCl und weitere fünf Minuten in 1x PBS inkubiert. Schließlich wurden sie für 20 min in 4% PFA fixiert. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 min in 1x PBS, 0,2 N HCl, RNase-freiem Wasser und

20 ng/ml Proteinase K-Lösung inkubiert. Es folgte eine weitere Fixierung in 4% PFA mit 0,2% Glutaraldehyd für 10 min und 5minütiges Waschen in 1x PBS. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 min in 1,5% Triethanolamin mit 0,2% Essigsäureanhydrid und 5 min in 0,85% NaCl inkubiert. Schließlich folgte die Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 75%, 100%) für jeweils zwei Minuten pro Lösung. Nachdem die Schnitte bei RT getrocknet waren, wurde die radioaktiv-markierte antisense-Sonde aufgetragen (circa 50µl/Objektträger). Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Gliedmaßenschnitte mit Folie abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte schließlich bei 70°C über Nacht in einer Kammer, die mit 5x SSC/50% Formamid-Lösung befeuchtet war.

Waschen der Schnitte und Dippen in Photoemulsion

Nach der Hybridisierung wurden die Gliedmaßenschnitte 30 Minuten in 5x SSC bei 55°C gewaschen und dabei die Abdeckfolie entfernt. Daraufhin wurden die Schnitte in 2x SSC für 30 Minuten bei 55°C gewaschen und schließlich mit 2,5 µg/ml RNase A in 1x Waschpuffer bei 37°C für 7 min behandelt. Dann folgten weitere Waschungen bei 55°C für 30 min in 2x SSC mit 50% Formamid und zweimal 30 min in 2x SSC. Nun wurden die Gliedmaßenschnitte dehydriert durch 30%, 50%, 70% und 90% Ethanol, das 0,3 M Ammonium-Acetat enthält. Schließlich wurden die Schnitte zweimal in 100% Ethanol inkubiert, getrocknet und über Nacht bei RT ein Röntgenfilm aufgelegt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte im Dunkeln im 40°C Wasserbad in eine Silberionen-enhaltende Photoemulsion gedippt. Die trockenen Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C für die Zeit gelagert, die vom entwickelten Röntgenfilm abgeschätzt wurde. Nach dieser Zeit wurden die in Photoemulsion getauchten Gliedmaßenschnitte in der Dunkelkammer entwickelt, indem sie fünf Minuten in 15°C warmer Entwickler-Lösung inkubiert wurden. Nach kurzem Waschen in Wasser wurden die Schnitte für 15 Minuten bei RT fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit 0,2% Toluidinblau mit 1% Borax gefärbt und in 30%, 50%, 75%, 95% und 100% Ethanol dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert und mit DPX-Mounting Medium eingedeckelt. Die Photos von diesen Schnitten wurden am Mikroskop im Dunkelfeld aufgenommen.

10x Waschpuffer:

4 M NaCl

100 ml Tris, pH 7,5

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

3.7.2 Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung (*Whole mount*)

In Mausembryonen der Stadien E7.5 bis E13.5 wird diese Methode angewandt, um die Expression von Genen im ganzen Organismus nachzuweisen. Hierzu wird eine Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonde zur Hybridisierung eingesetzt.

Vorbereitung der Embryonen

Die Embryonen wurden über Nacht in 4% PFA fixiert und dann zweimal fünf Minuten in PBT gewaschen. Schließlich wurden die Embryonen in mit PBT-verdünnten Methanol-Lösungen (25%, 50%, 75%) für jeweils 5 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 100% Methanol wurden die Embryonen bis zum Gebrauch bei -20°C in 100% Methanol aufbewahrt.

Markierung der RNA-Sonde mit Digoxigenin

Die Herstellung der linearisierten DNA für die *in vitro* Transkription erfolgte wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Die *in vitro* Transkription wurde für 90 min bei 37°C mit entsprechender RNA-Polymerase (Kapitel 3.1.11) durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 500 ng linearisierte DNA
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 2 µl Dig RNA Labeling Mix
- 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µl RNA-Polymerase (SP6, T7, T3)
- ad 20 µl DEPC-H₂O

Nach 15minütiger Behandlung bei 37°C mit 20 U Rnase-freier DNase wurde die RNA-Probe mit 100 µl TES verdünnt und mit 10 µl 4 M LiCl und 300 µl 100% Ethanol für 30 min bei -20°C präzipitiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen, getrocknet und in 100 µl TES resuspendiert. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität wurden 2 µl der gelösten RNA-Probe auf ein 1% TBE-Gel aufgetragen (Kapitel 3.2.2). Bis zum Gebrauch wurden die Dig-markierten Proben bei -20°C gelagert.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen in kleine Gläschen überführt und in PBT-verdünnten Methanol-Lösungen (75%, 50%, 25%) für je 5 min bei RT unter Schütteln rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in PBT für je fünf Minuten wurden die Embryonen 60 min in PBT-haltiges 6% H₂O₂ überführt. Danach folgte eine Behandlung mit Proteinase K-Lösung. Je nach Stadium der Mausembryonen wurde eine unterschiedliche Proteinase K-Konzentration sowie Inkubationszeit gewählt:

Maus < E11.5: 10 µg/ml, 10 min, RT

Maus ≥ E11.5: 40 µg/ml, 10 min, RT

Maus ≥ E13.5: 40 µg/ml, 20 min, RT

Mit frischer PBT-haltiger 0,2% Glycin-Lösung wurde die Proteinase K für 10 Minuten bei Raumtemperatur inaktiviert und dann die Embryonen für 20 min bei RT in PBT-haltigem, 4% PFA mit 0,2% Glutaraldehyd nachfixiert. Die Embryonen wurden dann zweimal für je fünf Minuten bei RT in PBT gewaschen und schließlich 1 h bei 70°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurde die Dig-markierte antisense-Sonde 1:200 in Hybridisierungslösung verdünnt und die Embryonen in dieser Lösung über Nacht bei 70°C inkubiert.

Hybridisierungslösung:

50% Formamid (deionisiert)

5x SSC, pH 4,5

50 µg/ml Hefe-t-RNA

1% (w/v) SDS

50 µg/ml Heparin

Waschen und Antikörper-Inkubation

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen zweimal mit 70°C-vorgewärmter Waschlösung I für jeweils 30 min bei 70°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Danach folgten zwei weitere Waschschr itte mit Waschlösung II für je 30 Minuten bei 65°C. Nun wurden die Embryonen dreimal 5 min bei RT in 1x TBST gewaschen und daraufhin in 10% Schaf-Serum (in 1x TBST) für 2,5 h bei Raumtemperatur geblockt.

Zur Prä-Absorption des Antikörpers wurden zunächst 3 mg Böh ringer Blocking Reagenz in 1 ml 1x TBST für 30 min bei 70°C unter Schütteln gelöst. Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer und Abkühlen auf Eis wurden 10 µl Schaf-Serum und

2 µl des Antikörpers Anti-Dig-AP Fab dazugegeben und 60 min bei 4°C geschwenkt. Danach folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in einem 15 ml Falcon-Gefäß gesammelt und mit 1% Schaf-Serum (in 1x TBST) auf 4 ml aufgefüllt. Abschließend folgte eine erneute Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Diese Lösung ist ausreichend für die Behandlung von vier Embryonen.

Nun wurde das Blocking-Serum von den Embryonen entfernt und pro Embryo 1 ml der Antikörper-Lösung zugegeben. Die Embryonen wurden vorsichtig über Nacht bei 4°C geschüttelt.

Waschlösung I:

50% Formamid
5x SSC, pH 4,5
1% (w/v) SDS

Waschlösung II:

50% Formamid
2x SSC, pH 4,5

Waschen der Embryonen

Am folgenden Tag wurden die Embryonen zunächst dreimal fünf Minuten in 1x TBST unter Schütteln bei RT gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach folgten weitere fünf Waschschrte für je 1-1,5 h in 1x TBST bei Raumtemperatur. Über Nacht wurden die Embryonen schließlich in 1x TBST mit 2 mM Levamisol bei 4°C gewaschen.

Detektion

Zur Detektion wurden die Embryonen dreimal für je 10 Minuten bei RT in NTMT gewaschen und danach in BM Purple bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurden die Embryonen zweimal für 10 min im Dunkeln in NTMT gewaschen und die Färbung durch 10minütige Inkubation in PBT (pH 5,5) bei RT gestoppt. Schließlich wurden die gefärbten Embryonen in 4% PFA mit 0,1% Glutaraldehyd für 60 min bei RT nachfixiert und danach zweimal in PBT gewaschen. Die Embryonen wurden daraufhin in PBT (pH 5,5) bei 4°C gelagert.

NTMT:

100 mM NaCl
100 mM Tris-HCl, pH 9,5
50 mM MgCl
1% (v/v) Tween 20
2 mM Levamisol

3.8 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Flaschen bzw. Well-Platten von Corning (Kaiserslautern) und Sarstedt (Nümbrecht). Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zentrifugation von Zellen wurde immer für 5 min bei 1.000 rpm und RT durchgeführt.

3.8.1 Kultivierung von primären Chondrozyten in Micromass-Kulturen

Micromass-Kulturen stellen ein *in vitro* Modell der Chondrogenese dar, da in hoher Dichte ausgesäte mesenchymale Zellen ähnlich zu Chondrozyten differenzieren wie *in vivo* (Mello und Tuan, 1999). In Micromass-Kulturen bilden die Zellen nach einigen Tagen Aggregate, sogenannte Nodules, die zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren können. Zur Isolierung der mesenchymalen Zellen aus Gliedmaßen von E12.5 *Ulnaless*-Mutanten, wurden zunächst die beiden Gliedmaßenknospen der Vorderextremitäten eines Embryos gesammelt und in sterilem 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Gliedmaßenknospen für 15 min bei 37°C mit 0,25 U Dispase behandelt und erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Gewebe durch 30minütige Inkubation bei 37°C in 250 µl Collagenase-Lösung aufgeschlossen. Schließlich wurde 1 ml Zellkultur-Medium hinzugegeben, die Zellen resuspendiert und durch ein 40 µm Zellsieb gegeben. Dieses Sieb wurde nochmal mit 10 ml Medium gewaschen und die gesamte Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Konzentration der Zellen auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden dann als 10 µl-Tropfen in einer 48-Well-Platte ausgesät und 60 min im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen adhäriert waren. Anschließend wurde vorsichtig 240 µl Medium pro Well hinzugegeben und die Zellen bis zur weiteren Analyse bei 37°C inkubiert. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Collagenase-Lösung:

0,3 U/ml Collagenase NB4
5% FCS
0,05% Trypsin/EDTA

Zellkultur-Medium:

DMEM/F12(1:1)
10% FCS
1% Penicillin/Streptomycin

3.8.2 Alcianblau-Färbung von Micromass-Kulturen

Die in Micromass-Kulturen gebildeten Nodules können mit Hilfe des kationischen Färbemittels Alcianblau gefärbt werden. Durch Alcianblau werden Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix blau gefärbt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Danach folgten zwei Waschschr tte mit 1x PBS und anschließender Inkubation für drei Minuten in 0,1 N HCl bei RT. Schließlich wurden die Micromass-Kulturen über Nacht bei Raumtemperatur mit Alcianblau gefärbt. Am nächsten Tag wurden die gefärbten Kulturen mit 1x PBS gewaschen und die gefärbten Nodules von zwei Personen gezählt.

Alcianblau-Färbelösung:

1% (w/v) Alcianblau 8 GX
in 0,1 N HCl, pH 1,0

3.8.3 Transiente Transfektion von mesenchymalen Zellen

Die Transfektion von mesenchymalen Zellen erfolgte mit Hilfe des „Amaya Nucleofector T Kits“ (Lonza). Nach Isolierung von mesenchymalen Zellen aus den Gliedmaßenknospen von E12.5 NMRI-Mäusen (Kapitel 3.8.1) wurden die Zellen nicht als Micromass-Kulturen, sondern als *Monolayer* ausgesät. Nach einem Tag in Kultur wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und dann mit 0,05% Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37°C vereinzelte. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und 2×10^6 Zellen pro Transfektionsansatz durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde mit 50 µl „Nucleofector T“ resuspendiert, die zu transfizierenden Plasmide hinzugegeben und diese Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transfektion erfolgte im Nucleofector-Gerät mit dem Programm T-010. Danach wurden die transfizierten Zellen sofort in 5 ml Zellkultur-Medium überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und schließlich in 100 µl pro Well (2×10^5 Zellen) einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät.

Zellkultur-Medium:

DMEM/F12(1:1)
10% FCS
1% Penicillin/Streptomycin

3.8.4 Luciferase-Assay

Zur Identifikation von *Ihh*-Enhancern wurden die zu analysierenden DNA-Fragmente (Intron, T1, T3, T5) durch PCR vom BAC RP23-430G15 amplifiziert (Kapitel 3.2.1) und in einen TOPO-Vektor subkloniert (Kapitel 3.2.12). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden diese in den pGL4.23-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält einen Minimalpromotor, das *Firefly*-Luciferase *luc2*-Reportergen und ein SV40-Polyadenylierungssignal (Abb. 3.4). Die Transfektion dieser Enhancer-pGL4.23-Konstrukte erfolgte in mesenchymalen Zellen aus Gliedmaßen von E12.5 NMRI-Mausembryonen, wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben. Jeder Transfektionsansatz bestand aus einem 2 µg DNA-Gemisch aus Enhancer-pGL4.23-Konstrukt (1,9 µg) und 0,1 µg des phRG-TK-Vektors (Abb. 3.4), der die *Renilla*-Luciferase kodiert. Um den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Enhancer zu untersuchen, wurde die Transfektion mit einem 2 µg DNA-Gemisch aus 0,95 µg Enhancer-pGL4.23-Konstrukt, 0,95 µg eines Expressionsvektors oder des zugehörigen Leervektors und 0,1 µg des phRG-TK-Vektors durchgeführt. Weiterhin sollte der Effekt von Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) auf die putativ regulatorischen Sequenzen des *Ihh*-Promotors analysiert werden. Dazu wurden die Zellen mit 1,9 µg des pGL4.23-Enhancer-Konstrukts und 0,1 µg des phRG-TK-Vektors transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und 100 ng/ml humanes BMP2 den entsprechenden Proben zugegeben. Insgesamt 48 h nach der Transfektion wurden der Luciferase-Assay mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und in 1x Lysis-Puffer mindestens 30 min lysiert. Die Aktivitäten der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase in den transfizierten Zellen wurden nach Herstellervorschrift mit dem „Centro96 Luminometer“ gemessen und die Aktivität der *Firefly*-Luciferase zur Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde jede Transfektion mindestens dreimal durchgeführt und die erhaltenen relativen Luciferase-Werte mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests ausgewertet.

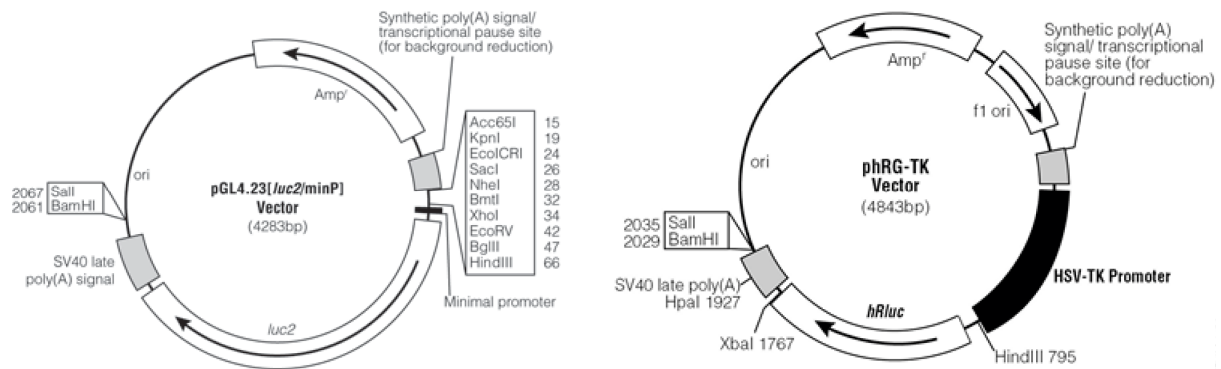


Abb. 3.4: Karten der verwendeten Luciferase-Vektoren. Links: Klonierungsvektor pGL4.23, der einen Minimalpromotor und ein *luc2*-Reportergen enthält, das die *Firefly*-Luciferase kodiert. Rechts: Expressionsvektor phRG-TK, der die *Renilla*-Luciferase (*hRluc*) unter einem *HSV-TK*-Promotor exprimiert.

3.8.5 Kultivierung von Gliedmaßen der Maus

Die Vordergliedmaßen von E13.5 *Ulnaless*-Embryonen wurden in steriles 1x PBS mit 1% Antibiotic/Antimycotic überführt und Haut und Muskeln weitestgehend entfernt. Die äußere Kammer der „in vitro fertilization dish“-Kulturschale wurde mit 5 ml sterilem 1x PBS gefüllt. Die innere Kammer wurde dagegen mit 1 ml Medium für Gliedmaßen-Kulturen gefüllt. In diese Kammer wurde ein Metallgitter gesetzt, auf das 0,8 µm Nitrocellulose-Filterpapier gelegt wurde. Die präparierten Extremitäten wurden auf dieses Nitrocellulose-Papier gelegt und für vier Tage im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte eine Behandlung mit 10 µM Cyclopamin. Es wurde jeden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

Medium für Gliedmaßen-Kulturen:

100 ml Biggers Medium
0,1% BSA
700 µl 200 mM Glutamin
1 ml Antibiotic/Antimycotic

3.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Rangsummentest mit Hilfe des Programms „R“ (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Der Rangsummentest nach Wilcoxon ist ein nichtparametrisches Verfahren zum Vergleich der Verteilungen zweier Stichproben. Dieser Test wird vor allem dann angewandt, wenn die Messwerte nicht normalverteilt sind. Der Wilcoxon-Rangsummentest vergleicht statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten

Der Einfluss von posterioren *Hoxa*- und *Hoxd*-Genen auf die Differenzierung der Chondrozyten sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit einer morphologischen sowie molekularen Analyse der Vordergliedmaßen von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.3.5), dient die *Ulnaless*-Maus als Modell für die *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutation. Der Vorteil, die Vorderextremitäten der *Ulnaless*-Maus zu analysieren, besteht vor allem in der Dominanz der Mutation, da dadurch eine hohe Anzahl an mutanten Tieren untersucht werden kann.

4.1.1 Phänotyp der Vorderextremitäten von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mäusen

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass die *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutante und die *Ulnaless*-Mutante stark verkürzte Vorderextremitäten besitzen (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995; Davisson und Cattanaach, 1990; Herault et al., 1997; Peichel et al., 1996; Peichel et al., 1997). Der Phänotyp der Vordergliedmaßen von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mäusen ist in Abb. 4.1 dargestellt. Die Vorderextremitäten beider Mutanten wurden zunächst im postnatalen Stadium 1 (P1) bzw. am Tag der Geburt (P0) präpariert und mittels Alcianblau/Alizarinrot gefärbt. Während Alcianblau den Knorpel blau färbt, wird der Knochen durch Alizarinrot rot angefärbt. Beide Mauslinien weisen zu diesen postnatalen Zeitpunkten eine Ossifikation der Röhrenknochen auf. Dennoch sind Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erheblich verkleinert (Abb. 4.1B, D). Auffallend ist außerdem der stark gebogene Radius sowie die abgewinkelte Hand der *Ulnaless*-Mutante (Abb. 4.1D). Der Radius der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutante ist im Vergleich nur leicht gebogen (Abb. 4.1B).

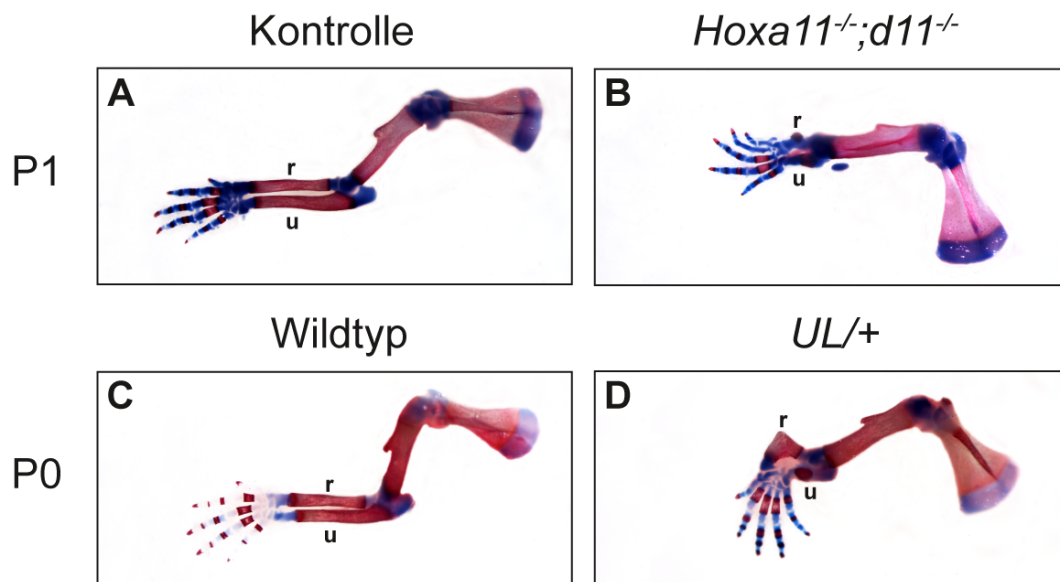


Abb. 4.1: Die Vorderextremitäten von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mäusen sind **erheblich verkürzt**. Die Vordergliedmaßen der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutante (B) wurden im Stadium P1 präpariert und mit Alcianblau/Alizarinrot gefärbt. Die Vorderextremitäten von *Ulnaless*-Mutanten (D) wurden dagegen im Stadium P0 präpariert und gefärbt. Im Vergleich zur Kontrolle (A) bzw. zum Wildtyp (C) zeigen beide Mutanten erheblich verkürzte Ulnae und Radii (B, D). 10x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

4.1.2 Die Ulna von *Ulnaless*-Mäusen dient als Modell der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutation

Durch den morphologischen Vergleich der Vordergliedmaßen von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Embryonen sollte bestätigt werden, dass die *Ulnaless*-Maus zur Analyse der Chondrozytendifferenzierung als Modell für die *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutation fungieren kann. Da im Embryonalstadium E14.5 und E16.5 die verschiedenen Stadien der Chondrozytendifferenzierung am besten zu erkennen sind, wurden die Vorderextremitäten von beiden Mutanten an diesen Tagen zur morphologischen Analyse histologisch nach Safranin-Weigert gefärbt.

Im Knorpel von E14.5 und E16.5 Wildtyp-Gliedmaßen werden verschiedene Zonen unterschieden, die den unterschiedlichen Stadien der Chondrozytendifferenzierung entsprechen. Am Gelenk befinden sich runde, wenig-proliferierende Chondrozyten, die als distal bezeichnet werden. Nach diesen distalen Zellen folgen die stark-proliferierenden, kolumnaren Chondrozyten, die abgeflacht und in Säulen angeordnet sind. Schließlich sind prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten zu finden, deren Volumen im Verlauf der Differenzierung zunimmt (Abb. 1.2, Abb. 4.2A-C, Abb. 4.3A-C).

Im Stadium E14.5 ist in Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Gliedmaßen keine Differenzierung der Chondrozyten zu den verschiedenen Subpopulationen zu erkennen. Die Chondrozyten haben alle eine runde Form und besitzen keine Orientierung in den beiden Knorpelanlagen (Abb. 4.2F, I). Die Chondrozyten ähneln morphologisch dem distalen Zelltyp.

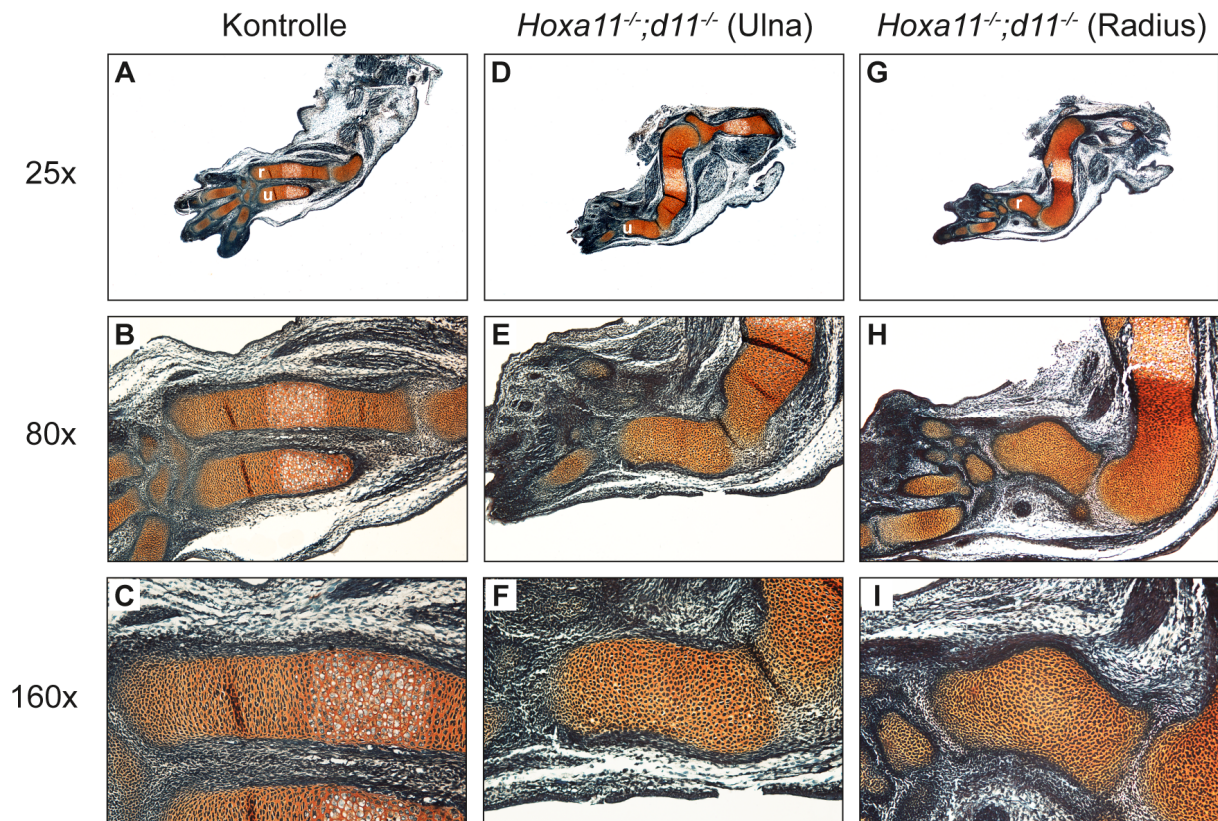


Abb. 4.2: Die Chondrozyten in Ulna und Radius von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Gliedmaßen entsprechen dem distalen Zelltyp. Paraffin-Schnitte von Vordergliedmaßen der E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten (D-I) und Kontrollembryonen (A-C) wurden nach Safranin-Weigert gefärbt. In diesem Stadium sind sowohl in der Ulna (D-F) als auch im Radius (G-I) von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen keine kolumnaren und hypertrophen, sondern nur distale Chondrozyten zu erkennen. Oben: 25x Vergrößerung, Mitte: 80x Vergrößerung, Unten: 160x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Im Gegensatz zu E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen ist in E14.5 *Ulnaless*-Extremitäten nur in der Ulna die Chondrozytendifferenzierung inhibiert (Abb. 4.3). Dort sind ungeordnete, runde Chondrozyten zu sehen, die morphologisch ebenfalls dem distalen Zellcharakter zu entsprechen scheinen (Abb. 4.3F). Im Radius sind dagegen hypertrophe Chondrozyten zu sehen (Abb. 4.3I, Pfeil), die auf eine weniger gestörte Differenzierung der Chondrozyten schließen lassen.

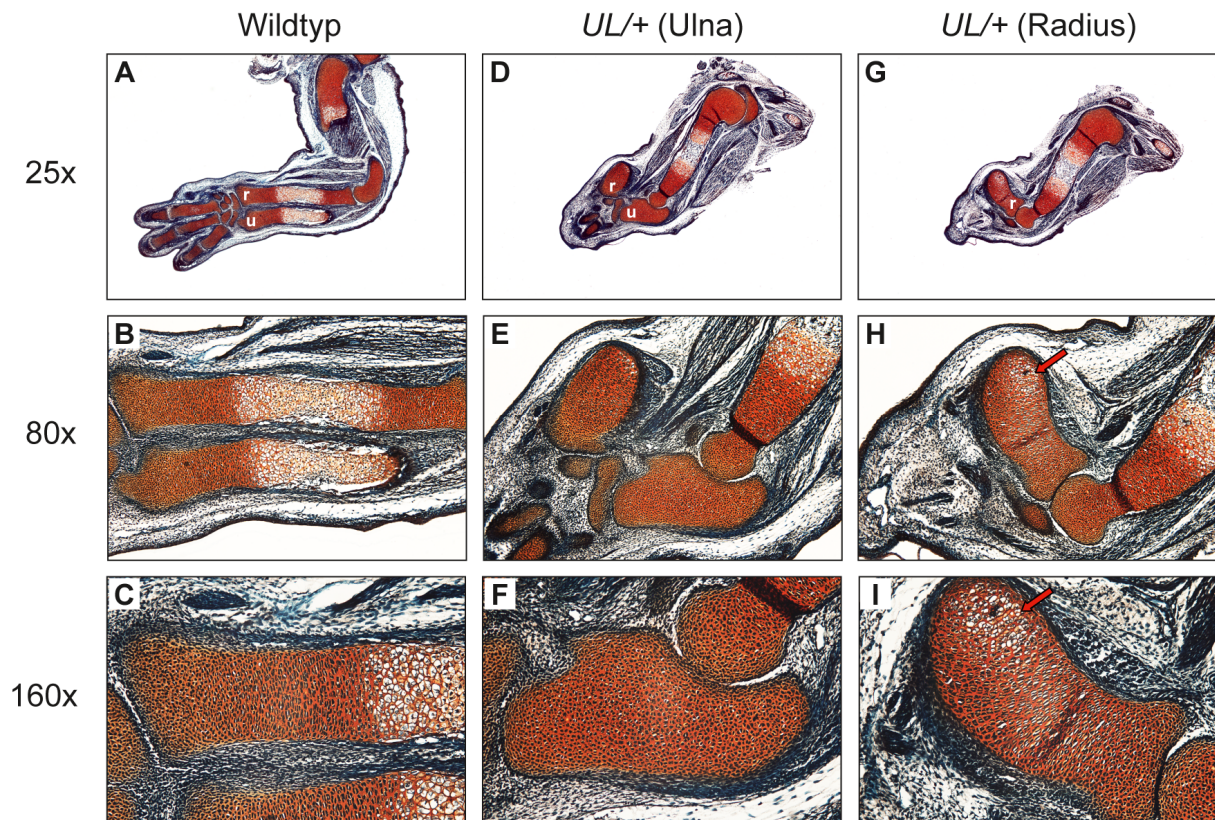


Abb. 4.3: In der Ulna von E14.5 *Ulnaless*-Gliedmaßen sind keine kolumnaren und hypertrophen Chondrozyten vorhanden. Safranin-Weigert-gefärbte Schnitte der Vorderextremitäten von E14.5 *Ulnaless*-Mutanten (D-I) und des Wildtyps (A-C) zeigen die verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten. In der stark verkleinerten Ulna (D-F) der *Ulnaless*-Mutante sind im Gegensatz zum Wildtyp keine kolumnaren und hypertrophen Chondrozyten zu finden, sondern nur Zellen, die den distalen Chondrozyten gleichen. Im Radius der *Ulnaless*-Gliedmaßen wurden jedoch hypertrophe Chondrozyten in dessen Bogen ermittelt (G-I, siehe Pfeile). *Oben:* 25x Vergrößerung, *Mitte:* 80x Vergrößerung, *Unten:* 160x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Im Embryonalstadium E16.5 ist in der Mitte der Wildtyp-Gliedmaßen bereits trabekulärer Knochen zu erkennen (Abb. 4.4A-C und Abb. 4.5A-C). In der Ulna von E16.5 *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}-Doppelmutanten liegen jedoch weiterhin Chondrozyten eines frühen Differenzierungsstadiums vor. Die Zellen sind rund, ungeordnet und scheinen dem distalen Zelltyp zu entsprechen (Abb. 4.4F). Im Radius wurden in diesem Stadium hingegen wenige kolumnare Chondrozyten nachgewiesen, die allerdings nicht wie in der Kontrolle parallel zur longitudinalen Achse (Abb. 4.4C, Ausschnitt), sondern senkrecht dazu angeordnete Säulen (Abb. 4.4I, Ausschnitt) bilden.

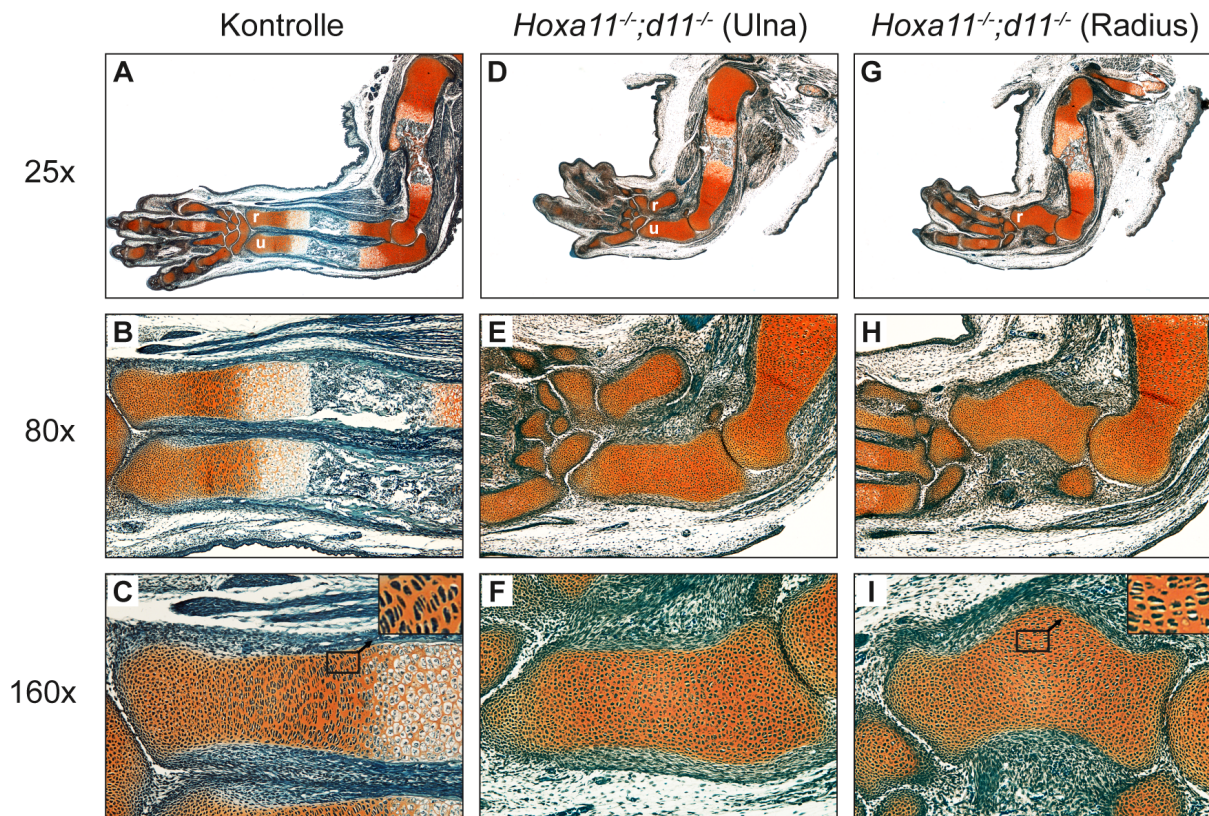


Abb. 4.4: Die kolumnaren Chondrozyten im Radius von E16.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Gliedmaßen sind senkrecht zur longitudinalen Achse orientiert. Mittels Safranin-Weigert-Färbung wurden die Vorderextremitäten von E16.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten (D-I) und der Kontrollembryonen (A-C) gefärbt. In *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen konnten sowohl in der Ulna (D-F) als auch im Radius (G-I) keine hypertrophen Chondrozyten detektiert werden. Im Radius sind jedoch kolumnare Chondrozyten zu sehen, die nicht wie in der Kontrolle parallel zur Längsachse (C, siehe Ausschnitt), sondern senkrecht hierzu angeordnete Säulen bilden (I, siehe Ausschnitt). Oben: 25x Vergrößerung, Mitte: 80x Vergrößerung, Unten: 160x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Wie in E16.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen ist im Radius von E16.5 *Ulnaless*-Vorderextremitäten eine fortschreitende Differenzierung der Chondrozyten zu erkennen. Jedoch wurden deutliche Regionen kolumnarer und hypertropher Chondrozyten sowie mineralisierter Matrix detektiert (Abb. 4.5I, Pfeil). Demzufolge entspricht die Chondrozytendifferenzierung im Radius im Wesentlichen der des Wildtyps. Dagegen ist in der Ulna die Differenzierung der Chondrozyten immer noch blockiert. Die Zellen gleichen weiterhin dem distalen Zelltyp (Abb. 4.5F).

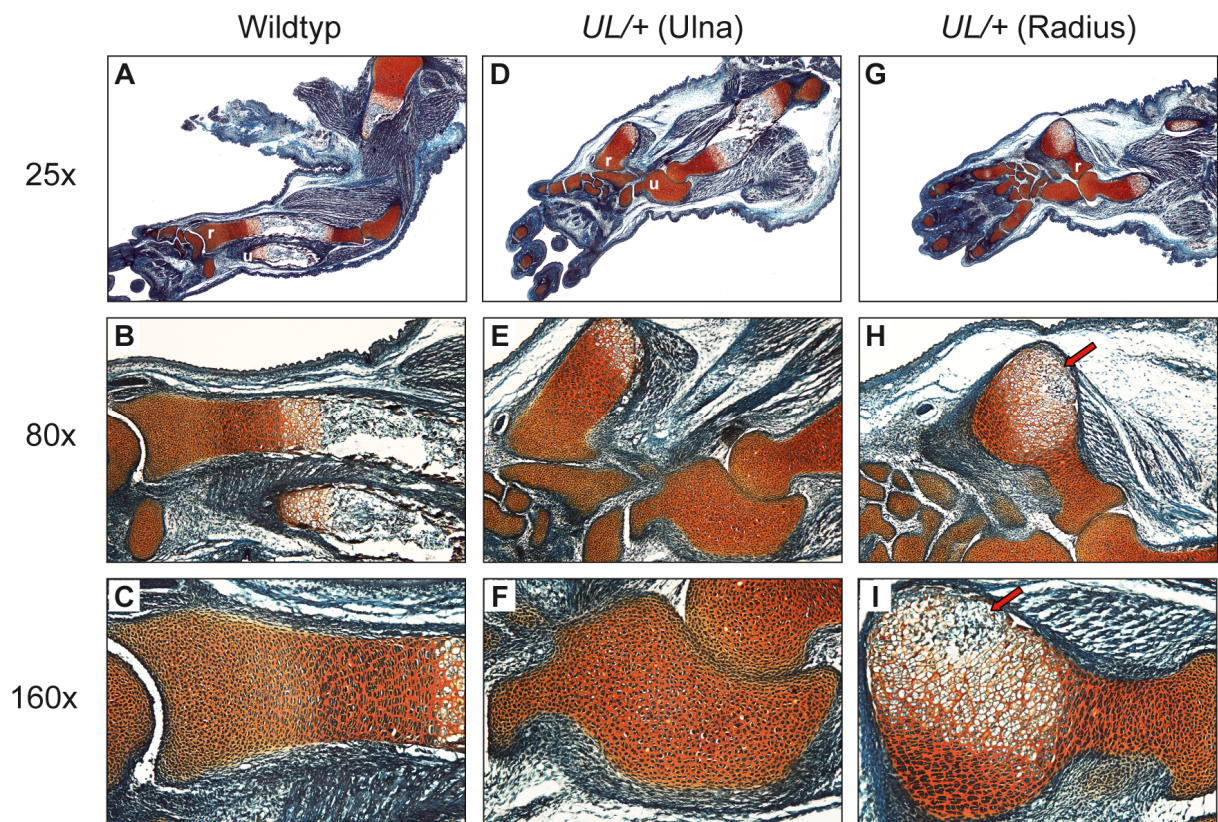


Abb. 4.5: In der Ulna von E16.5 *Ulnaless*-Gliedmaßen ist die Differenzierung der Chondrozyten blockiert. Die Safranin-Weigert-Färbung von Schnitten der E16.5 *Ulnaless*- (D-I) und Wildtyp-Vordergliedmaßen (A-C) zeigt, dass in diesem Stadium keine hypertrophen Chondrozyten in der Ulna (D-F) von *Ulnaless*-Gliedmaßen vorhanden sind. Dagegen weist der Radius nicht nur hypertrophe Chondrozyten auf, sondern auch eine mineralisierte Region, die sich im Bogen des Radius befindet (G-I, siehe Pfeile). *Oben:* 25x Vergrößerung, *Mitte:* 80x Vergrößerung, *Unten:* 160x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Zusammenfassend zeigt diese morphologische Analyse, dass nur die Ulna von *Ulnaless*-Mäusen als Modell für die *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}-Mutation angesehen werden kann, da nur die Ulna den Phänotyp von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen widerspiegelt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher nur die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten mit Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}-Mutanten verglichen. Im Folgenden werden diese Knorpelanlagen der beiden Mutanten als Zeugopod zusammengefasst.

4.1.3 Deutlich verzögerte hypertrophe Differenzierung im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten

Im Folgenden wurde die Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten während der Embryonalentwicklung im Detail analysiert.

Molekulare Analyse von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten im Stadium E14.5 und E16.5

Um den Schritt der Chondrozytendifferenzierung zu identifizieren, der im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Embryonen blockiert ist, wurden die Vorderextremitäten beider Mutanten auf molekularer Ebene mittels *in situ* Hybridisierung untersucht.

Zunächst wurde die Expression von *Ihh* und dessen Rezeptor *Ptch1* in *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten analysiert. Im Stadium E14.5 wird *Ihh* im Wildtyp stark in prähypertrophen und schwach in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 4.6A, G) (St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996). Im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vordergliedmaßen wurden in Übereinstimmung mit der morphologischen Analyse (Kapitel 4.1.2) keine *Ihh*-exprimierenden, hypertrophen Chondrozyten im Stadium E14.5 und E16.5 nachgewiesen (Abb. 4.6B, C, H, I, Pfeile; E16.5: Daten nicht gezeigt) (Boulet und Capecchi, 2004), sondern erst im Stadium E18.5 (Abb. 4.12E, F, K, L). Demzufolge ist die Chondrozytendifferenzierung in den Stadien E14.5 und E16.5 vor der Differenzierung zu prähypertrophen Chondrozyten blockiert.

Im Gegensatz zu *Ihh* ist dessen Rezeptor *Ptch1* im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Gliedmaßen jedoch sehr schwach exprimiert und ist vergleichbar mit der Expression in distalen Zellen des Wildtyps (Abb. 4.6E, F, K, L, Pfeile). Im Wildtyp ist *Ptch1* in allen proliferierenden Chondrozyten exprimiert. Die Expressionsstärke ist jedoch in distalen Zellen schwächer als in kolumnaren (Abb. 4.6D, J) (St-Jacques et al., 1999).

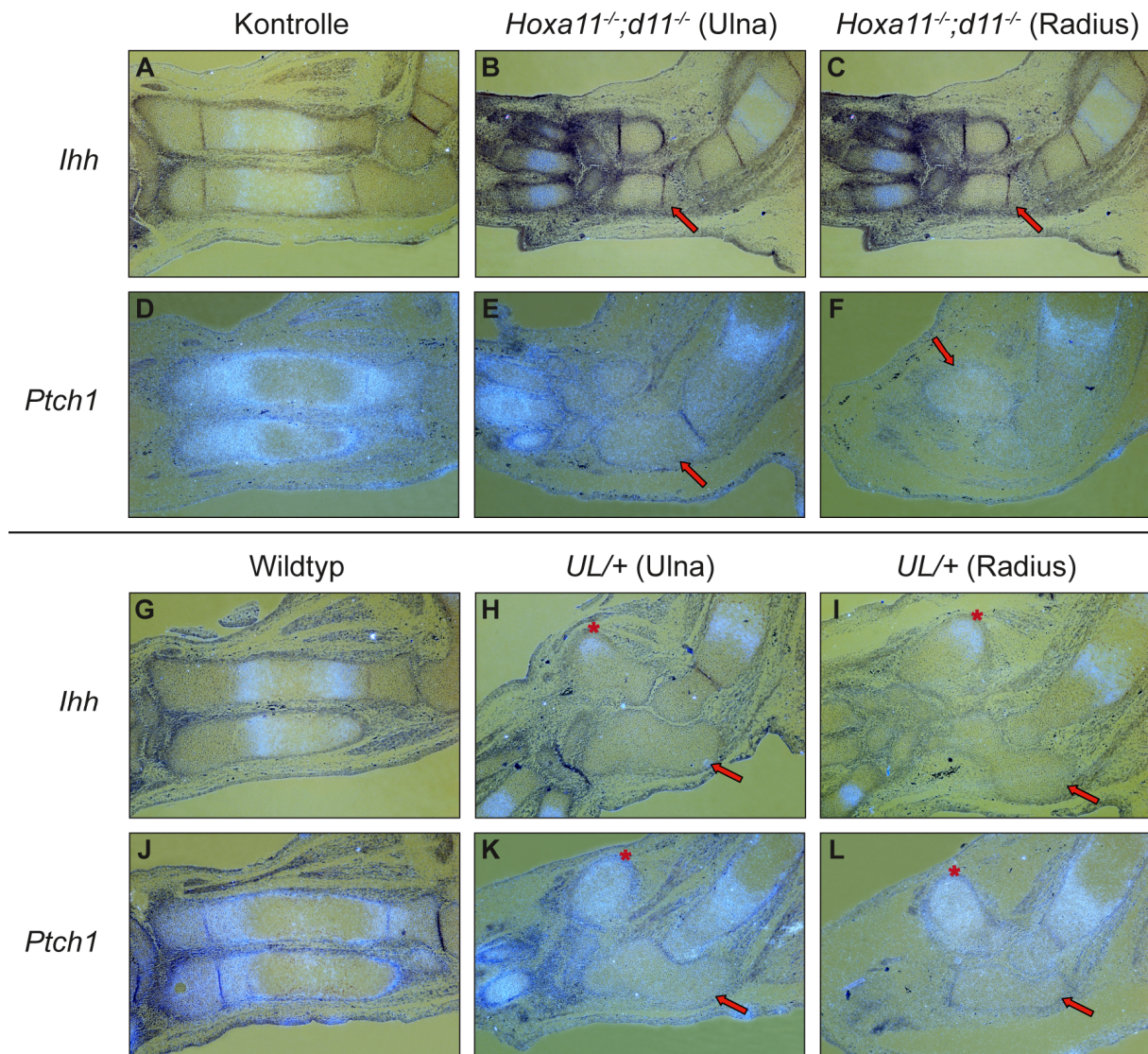


Abb. 4.6: Hypertrophe Chondrozyten sind in der Ulna von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Extremitäten nicht vorhanden. *Ihh*- (A-C, G-I) und *Ptch1*-Sonden (D-F, J-L) wurden auf Schnitten von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen (B, C, E, F), Kontrollgliedmaßen (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Vorderextremitäten (G, J) hybridisiert. Sowohl in Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten als auch in der Ulna von *Ulnaless*-Mäusen ist *Ihh* nicht exprimiert (B, C, H, I, siehe Pfeile). Im Radius von *Ulnaless*-Gliedmaßen ist allerdings ein *Ihh*-Signal zu erkennen (H, I, siehe *). *Ptch1* zeigt in Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten und in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten ein schwaches Expressionsniveau (E, F, K, L, siehe Pfeile). Dagegen ist im Radius von *Ulnaless*-Mäusen *Ptch1* stark exprimiert (K, L, siehe *). 80x Vergrößerung.

Da durch die bisherige molekulare Analyse eine blockierte Differenzierung der Chondrozyten am Tag E14.5 im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten festgestellt wurde, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob bereits die Bildung der Knorpelanlagen gestört ist. Dazu wurde die Expression des extrazellulären Matrixproteins *Col2a1* und des Transkriptionsfaktors *Sox9* analysiert, die sowohl in den frühen Kondensationen als auch in distalen und kolumnaren Chondrozyten koexprimiert sind (Abb. 4.7A, D, G, J)

(Ng et al., 1997; Wright et al., 1995; Zhao et al., 1997). In den Vordergliedmaßen von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten konnte weder ein Unterschied in der Lokalisation noch in der Expressionsstärke von *Col2a1* und *Sox9* zum Wildtyp festgestellt werden. Beide Gene sind in Ulna und Radius der beiden Mutanten in der ganzen Knorpelanlage mit gleichbleibendem Expressionsniveau exprimiert (Abb. 4.7). Demnach ist die frühe Chondrozytendifferenzierung nicht gestört.

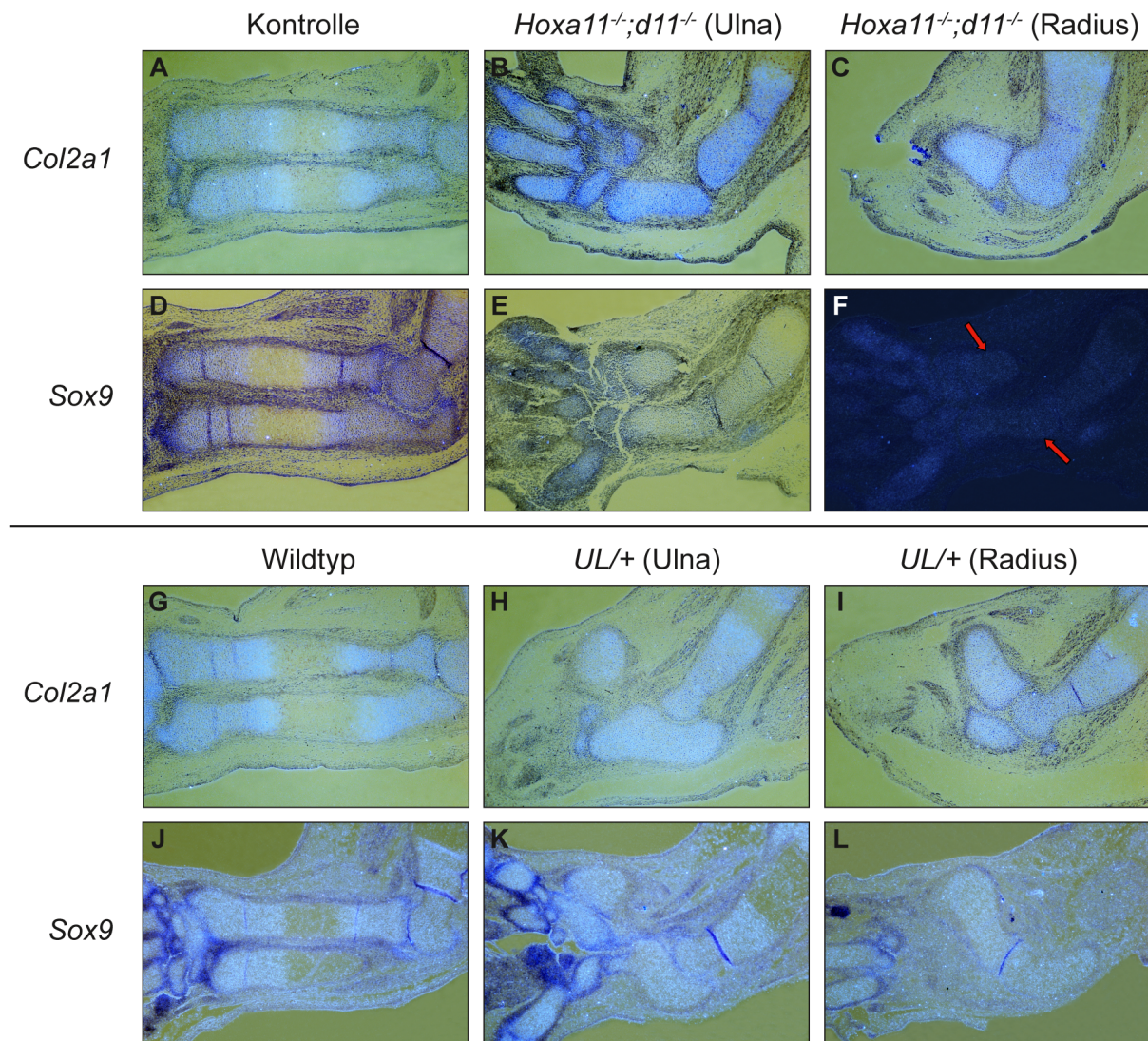


Abb. 4.7: Die frühe Chondrozytendifferenzierung ist in *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Gliedermaßen nicht gestört. *In situ* Hybridisierung auf Schnitten von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- Vorderextremitäten (B, C, E, F), Kontrollgliedmaßen (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Vorderextremitäten (G, J) mit antisense-Sonden für *Col2a1* (A-C, G-I) und *Sox9* (D-F, J-L). Beide Gene sind sowohl in der Ulna als auch im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten in der ganzen Knorpelanlage exprimiert. 80x Vergrößerung.

Ein Marker für proliferierende Chondrozyten ist *Fibroblast growth factor receptor 3* (*Fgfr3*). Dieses Gen ist in Gliedmaßen von E14.5 Wildtyp-Embryonen schwach in distalen und stark in kolumnaren Chondrozyten exprimiert (Abb. 4.8A, D) (Minina et al., 2005). Im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Vorderextremitäten wurde *Fgfr3* allerdings nur mit schwachem Expressionsniveau in der ganzen Knorpelanlage nachgewiesen (Abb. 4.8B, C, E, F, Pfeile). Diese äußerst schwache *Fgfr3*-Expression stimmt mit der Expressionsstärke in den distalen Zellen des Wildtyps überein (Abb. 4.8A-C, D-F, Pfeile) und deutet somit darauf hin, dass die Chondrozyten einen distalen Zellcharakter besitzen.

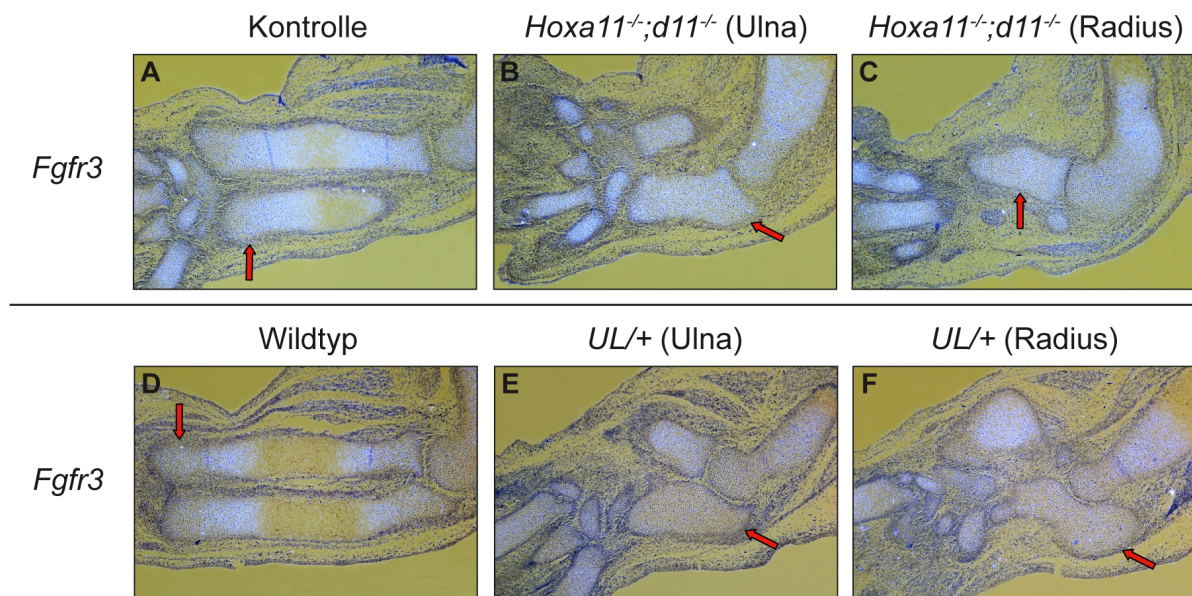


Abb. 4.8: Die *Fgfr3*-Expression in der Ulna von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Gliedmaßen weist auf schwach-proliferierende, distale Chondrozyten hin. Eine antisense-Sonde für *Fgfr3* wurde auf Schnitten von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Vordergliedmaßen (B, C), Kontrollgliedmaßen (A) sowie *Ulnaless*- (E, F) und Wildtyp-Vorderextremitäten (D) hybridisiert. Das Expressionsniveau von *Fgfr3* ist in Ulna und Radius der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Embryonen und in der Ulna von *Ulnaless*-Mäusen mit der Expression in distalen Chondrozyten im Wildtyp vergleichbar (siehe Pfeile). Im Radius von *Ulnaless*-Mutanten ist *Fgfr3* dagegen ähnlich wie im Wildtyp exprimiert (E, F). 80x Vergrößerung.

Um weitere Hinweise auf einen distalen Zelltyp der Chondrozyten im Zeugopod beider Mutanten zu erhalten, wurde die Expression der distalen Chondrozytenmarker *Fibroblast growth factor receptor 1* (*Fgfr1*) und *Upper zone of growth plate and cartilage matrix associated* (*Ucma*), in E16.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Vorderextremitäten untersucht.

Während in E16.5 Wildtyp-Vorderextremitäten die Expression von *Fgfr1* sowohl in distalen als auch in hypertrophen Chondrozyten zu finden ist (Abb. 4.9A, G) (Peters et al., 1992), wird *Ucma* im Wildtyp ausschließlich in distalen Chondrozyten exprimiert (Abb. 4.9D) (Tagariello et al., 2008). Im Zeugopod von E16.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten wurde die Expression von *Fgfr1* und *Ucma* nicht, wie erwartet, überall in der Knorpelanlage nachgewiesen, sondern nur in einzelnen Bereichen (Abb. 4.9). Es wurden demnach keine weiteren Hinweise auf einen distalen Zelltyp der Chondrozyten im Zeugopod von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten gefunden.

Auffällig bei dieser Expressionsanalyse war jedoch, dass das Expressionssignal von *Fgfr1* im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten an der anterioren und posterioren Seite zu finden ist und nicht in der proximalen und distalen Region wie im Wildtyp (Abb. 4.9A, C, Pfeil). Außerdem wurde festgestellt, dass *Ucma* in der Ulna von *Ulnaless*-Vordergliedmaßen nicht wie in Gliedmaßen von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Embryonen in den distalen Chondrozyten exprimiert ist (Abb. 4.9E, F, Pfeile), sondern diffus in der ganzen Knorpelanlage und mit stärkerem Expressionslevel nahe der Gelenksregion (Abb. 4.9K, Pfeil). Dieses Expressionsmuster erinnert an die Expression von *Ucma* im proximalen Ende der Ulna des Wildtyps, dem Olecranon (Abb. 4.9J, Pfeil) und wurde auch in der Ulna von E18.5 *Ulnaless*-Embryonen ermittelt (Abb. 4.12H, Pfeil).

Insgesamt ergab die molekulare Analyse der Chondrozytendifferenzierung in Ulna und Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten und in der Ulna von *Ulnaless*-Embryonen in den Stadien E14.5 und E16.5, dass die Chondrozyten weder distalen noch kolumnaren oder hypertrophen Zellcharakter aufweisen. Die Chondrozyten sind in einem frühen Stadium der Differenzierung arretiert.

Der Radius von *Ulnaless*-Mutanten zeigt dagegen auch auf molekularer Ebene eine normale Chondrozytendifferenzierung, da die untersuchten Chondrozytenmarker wie im Wildtyp exprimiert sind.

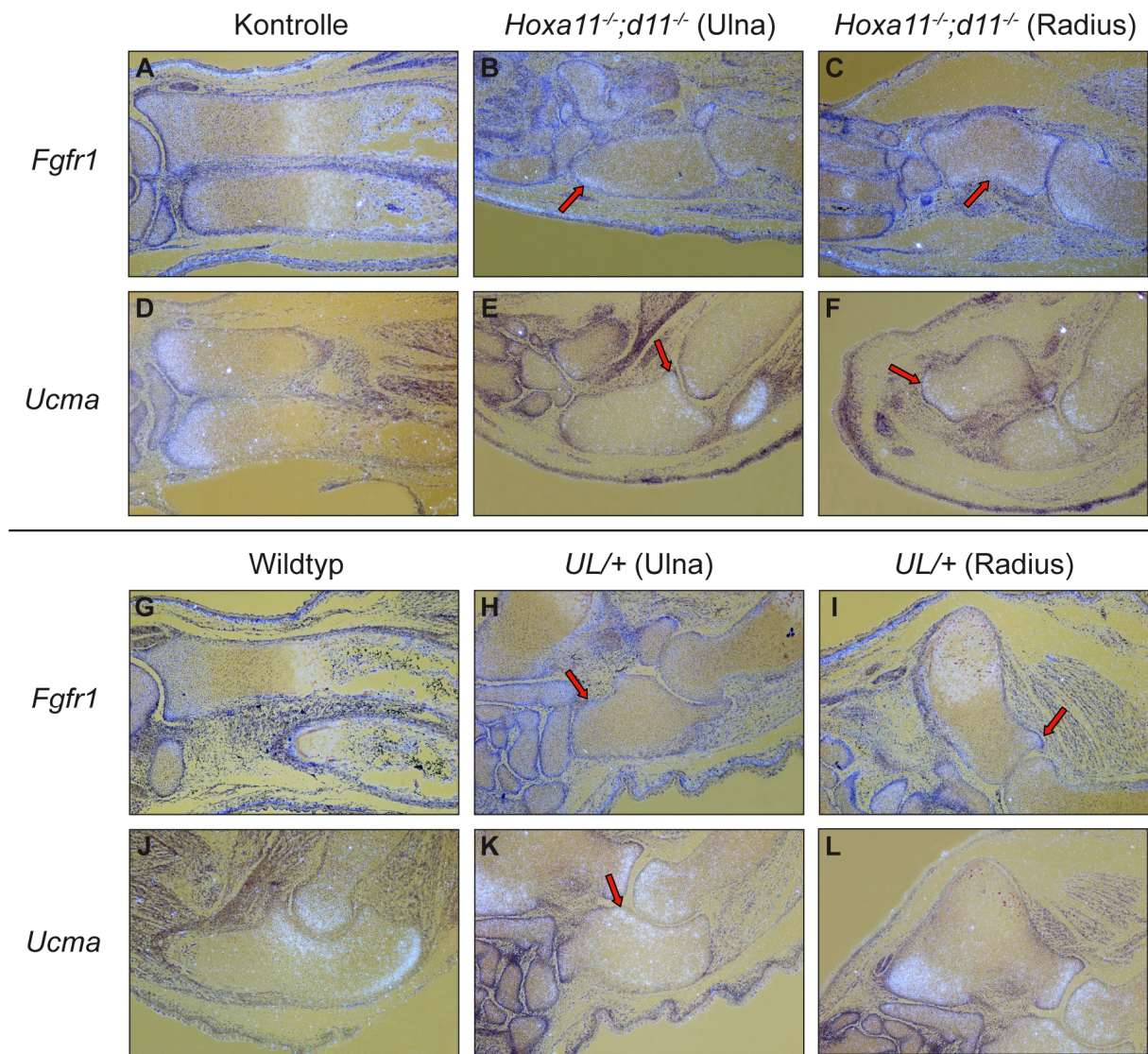


Abb. 4.9: Die Chondrozyten in der Ulna von E16.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Extremitäten besitzen keine distale Zellidentität. Radioaktiv-markierte Sonden für *Fgfr1* (A-C, G-I) und *Ucma* (D-F, J-L) wurden auf Schnitten von E16.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Vorderextremitäten (B, C, E, F) und Kontrollgliedmaßen (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Vordergliedmaßen (G, J) hybridisiert. *Fgfr1* ist in Ulna und Radius der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten nur in den äußersten Chondrozyten exprimiert, im Radius allerdings vor allem in anterior-posterioren Regionen (B, C, siehe Pfeile). In der Ulna von *Ulnaless*-Gliedermaßen ist *Fgfr1* nur anterior sehr schwach in periartikulären Chondrozyten exprimiert (H, siehe Pfeil). Im Radius ist *Fgfr1* dagegen wie im Wildtyp exprimiert (G, I). *Ucma* ist im Vergleich zur Kontrolle in Ulna und Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Gliedermaßen verringert in distalen Chondrozyten exprimiert (D-F, siehe Pfeile). Im Radius von *Ulnaless*-Gliedermaßen zeigt *Ucma* das gleiche Expressionsmuster wie im Wildtyp (L). In der Ulna von *Ulnaless*-Gliedermaßen ist *Ucma* hingegen diffus exprimiert und weist eine stärkere Expression im Bereich des Gelenks auf (K, siehe Pfeil). Dieses Expressionsmuster ist vergleichbar mit der *Ucma*-Expression im Olecranon des Wildtyps (J, K). 80x Vergrößerung.

Morphologische und molekulare Analyse von E18.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten

Da die Analyse von E14.5 und E16.5 Vordergliedmaßen der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten den Verlust von hypertrophen Chondrozyten im Zeugopod zeigte, jedoch bei beiden Mutanten postnatal Alizarinrot-gefärbter Knochen im Zeugopod zu finden ist (Abb. 4.1), sollte im Stadium E18.5 überprüft werden, ob und wie die hypertrophe Differenzierung erfolgt. Dazu wurden zunächst Safranin-Weigert-gefärbte Schnitte der Gliedmaßen morphologisch untersucht. Im Stadium E18.5 ist in Gliedmaßen des Wildtyps ein ausgeprägtes, primäres Ossifikationszentrum zu finden (Abb. 4.10A-C, Abb. 4.11A-C). Im Zeugopod von E18.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten konnte jedoch kein trabekulärer Knochen, sondern erstmals hypertrophe Chondrozyten nachgewiesen werden. Diese hypertrophen Zellen sind in der Mitte der Ulna zu finden, während sie im Radius nur in dessen Bogen lokalisiert sind (Abb. 4.10F, I, Pfeile).

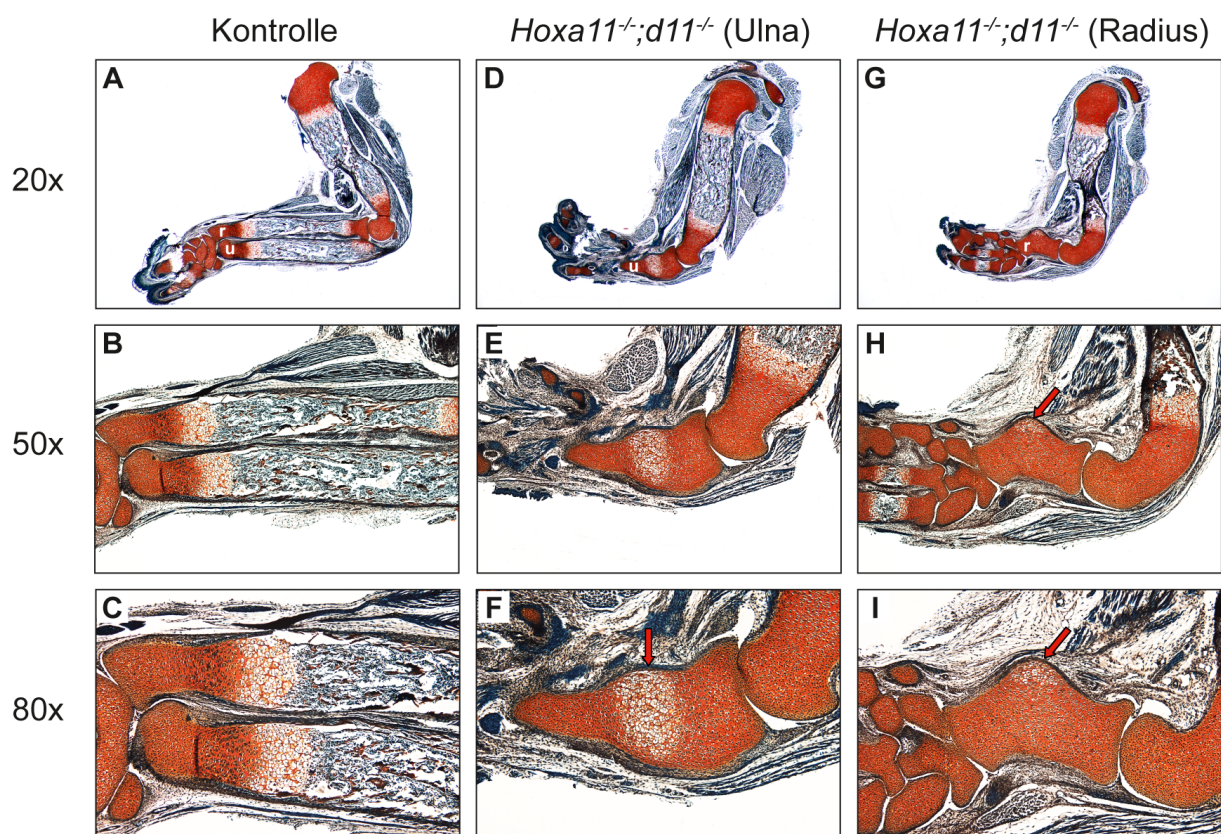


Abb. 4.10: Die Chondrozyten in Ulna und Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten differenzieren erst im Stadium E18.5 zu hypertrophen Zellen. Die Vorderextremitäten der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten (D-I) und der Kontrolltiere (A-C) wurden nach Safranin-Weigert gefärbt. Im Stadium E18.5 sind hypertrophe Chondrozyten in der Mitte der Ulna (D-F) von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten zu erkennen, während im Radius die hypertrophen Chondrozyten in dessen Bogen lokalisiert sind (F, I, siehe Pfeile). *Oben*: 20x Vergrößerung, *Mitte*: 50x Vergrößerung, *Unten*: 80x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Genauso wie in *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten setzt in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten im Stadium E18.5 ein. Die hypertrophen Chondrozyten liegen jedoch im Zentrum der Ulna und grenzen nicht wie im Wildtyp beidseitig an das Perichondrium, sondern sind von proliferierenden Chondrozyten umgeben (Abb. 4.11F, Pfeil).

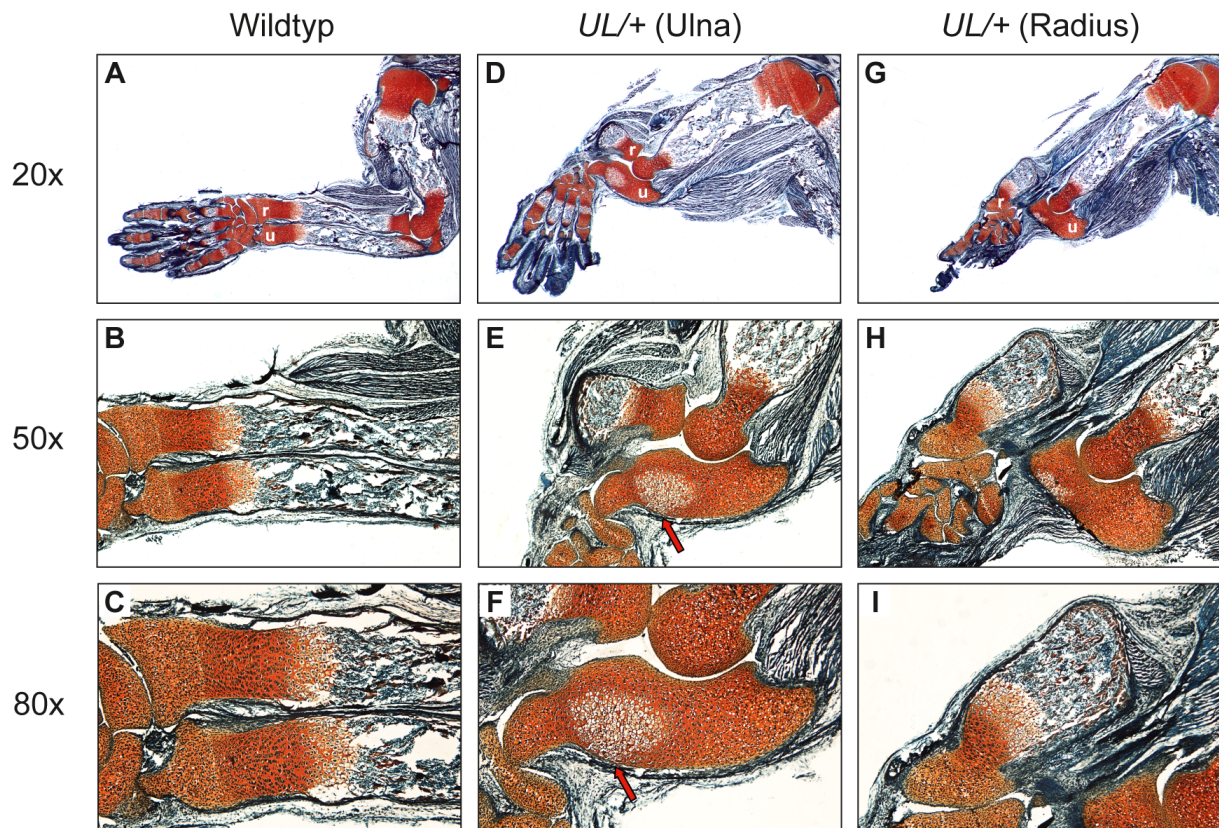


Abb. 4.11: Die hypertrophe Differenzierung findet im Zentrum der Ulna von E18.5 *Ulnaless*-Gliedermaßen statt. Safranin-Weigert-Färbung von E18.5 Vorderextremitäten der *Ulnaless*-Mutanten (D-I) und des Wildtyps (A-C). In *Ulnaless*-Gliedermaßen wurden hypertrophe Chondrozyten in der Mitte der Ulna (D-F) detektiert. Im Gegensatz zum Wildtyp sind diese jedoch nicht in einem Streifen angeordnet, sondern sind kreisförmig in der Mitte der Ulna lokalisiert (F, siehe Pfeil). Im gebogenen Radius der *Ulnaless*-Embryonen verläuft die Chondrozytendifferenzierung wie im Wildtyp (A-C, G-I). *Oben*: 20x Vergrößerung, *Mitte*: 50x Vergrößerung, *Unten*: 80x Vergrößerung. r=Radius, u=Ulna.

Auf molekularer Ebene zeigt sich ebenfalls, dass im Zeugopod von E18.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten eine hypertrophe Differenzierung stattfindet. Der prähypertrophe Chondrozytenmarker *Ihh* ist in diesem Stadium erstmals in Ulna und Radius beider Mutanten exprimiert (Abb. 4.12E, F, K, L). In der Ulna von E18.5 *Ulnaless*-Embryonen ist *Ihh* jedoch, im Gegensatz zum Wildtyp, kreisförmig um die hypertrophen Chondrozyten herum lokalisiert (Abb. 4.12K, Pfeil).

Das wildtypische Expressionsmuster des distalen Chondrozytenmarkers *Ucma* ist im Zeugopod der Mutanten ebenso wiederhergestellt (Abb. 4.12B, C, H, I). Auffällig ist jedoch erneut das Expressionsmuster von *Ucma* in der Ulna von E18.5 *Ulnaless*-Embryonen, das wie im Stadium E16.5 der Expression von *Ucma* im Olecranon des Wildtyps gleicht (Abb. 4.12G, H, Pfeil).

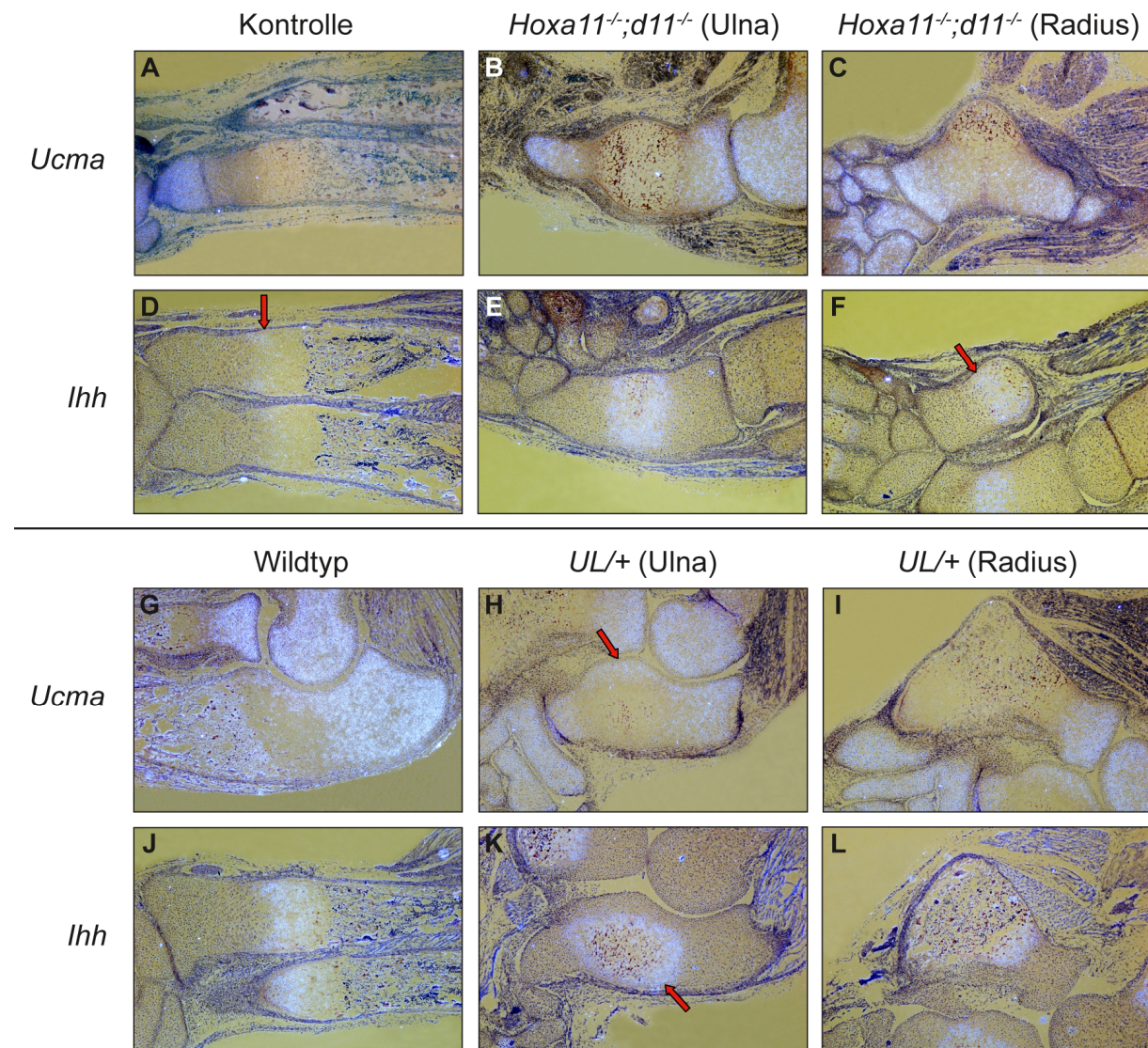


Abb. 4.12: Die hypertrophe Differenzierung in der Ulna von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Gliedermaßen ist erheblich verzögert. Antisense-Sonden für *Ucma* (A-C, G-I) und *Ihh* (D-F, J-L) wurden auf Vordergliedmaßenschnitte von E18.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten (B, C, E, F) und Kontrolltieren (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Embryonen (G, J) hybridisiert. Der distale Marker *Ucma* ist wie in der Kontrolle sowohl in der Ulna als auch im Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten in distalen Zellen exprimiert (A-C). Im Radius von *Ulnaless*-Gliedermaßen ist *Ucma* ebenfalls wie im Wildtyp in distalen Zellen exprimiert (I). In der Ulna ist *Ucma* dagegen in allen Zellen um die hypertrophen Chondrozyten herum zu finden (H, siehe Pfeil). Die Expression von *Ihh* in Ulna und Radius der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten und im Radius von *Ulnaless*-Mäusen entspricht der *Ihh*-Expression in der Kontrolle (D-F, J, L, siehe Pfeile). In der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten wurde *Ihh* allerdings um die hypertrophen Chondrozyten herum nachgewiesen (K, siehe Pfeil). 80x Vergrößerung.

Zusammenfassend zeigt die morphologische und molekulare Analyse, dass im Stadium E18.5 sowohl in Ulna und Radius der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten als auch in der Ulna von *Ulnaless*-Embryonen eine hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten stattfindet. Im Vergleich zum Wildtyp ist diese allerdings deutlich verzögert.

4.1.4 Die Chondrozyten der Ulna von E13.5 *Ulnaless*-Gliedermaßen besitzen keine Kompetenz zur hypertrophen Differenzierung

Während im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Embryonen *Ihh* nicht exprimiert ist (Abb. 4.6B, C, H, I, Pfeile), konnte im Stadium E18.5 jedoch ein *Ihh*-Expressionssignal detektiert werden (Abb. 4.12E, F, K, L, Pfeil). Da der Verlust von *Ihh* in *Ihh^{-/-}*-Mutanten allerdings zu einer beschleunigten, hypertrophen Differenzierung führt (St-Jacques et al., 1999), sollte die Funktionalität des *Ihh*-Signalwegs untersucht werden, um auszuschließen, dass *Ihh* im Stadium E14.5 im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten unter dem Detektionslimit exprimiert wird. Hierzu wurden die Vorderextremitäten von E13.5 *Ulnaless*-Embryonen in Kultur genommen, mit Cyclopamin behandelt und anschließend die Expression von *Ihh* in den behandelten Gliedmaßen untersucht.

Nach Behandlung der Vordergliedmaßen-Kulturen mit Cyclopamin wurde im Gegensatz zu den unbehandelten Gliedmaßen-Kulturen eine vorzeitige *Ihh*-Expression sowie eine beschleunigte hypertrophe Differenzierung in den Fingern sowohl der Wildtyp- als auch der *Ulnaless*-Gliedermaßen festgestellt (Abb. 4.13). Dagegen differenzierten die Chondrozyten der Ulna von Cyclopamin-behandelten *Ulnaless*-Gliedermaßen nicht zu hypertrophen Chondrozyten und exprimierten somit kein *Ihh* (Abb. 4.13D, Pfeil).

Folglich ist die Kompetenz der Chondrozyten in der Ulna von E13.5 *Ulnaless*-Gliedermaßen, zu hypertrophen Zellen zu differenzieren, inhibiert.

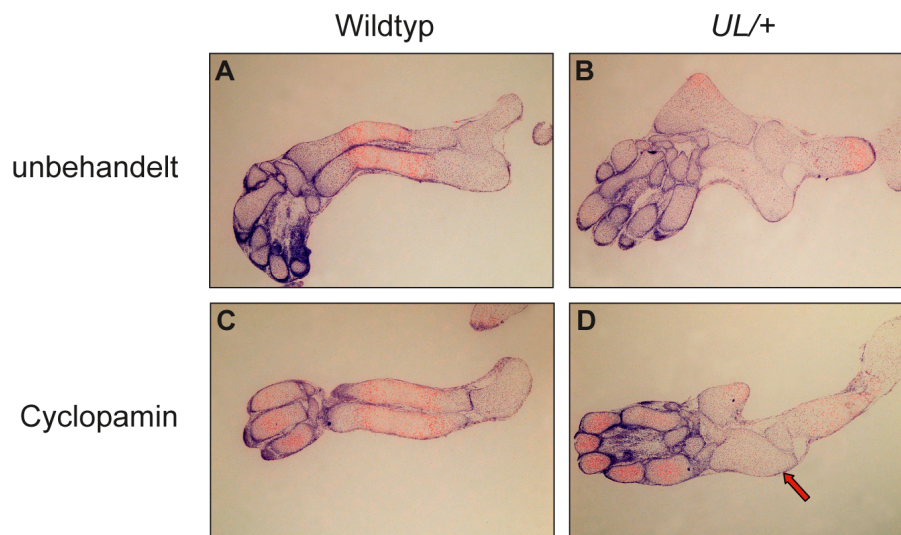


Abb. 4.13: Die Chondrozyten in der Ulna von E13.5 *Ulnaless*-Extremitäten besitzen keine Fähigkeit, zu hypertrophen Zellen zu differenzieren. Die Vordergliedmaßen von E13.5 Wildtyp- (A, C) und *Ulnaless*-Mäusen (B, D) wurden über vier Tage mit Cyclopamin behandelt. Anschließend wurde die Expression von *Ihh* in diesen behandelten Gliedmaßen (C, D) mit der *Ihh*-Expression in unbehandelten Vorderextremitäten (A, B) verglichen. Durch Cyclopamin-Behandlung wurde in den Fingern von Wildtyp- und *Ulnaless*-Gliedmaßen die Expression von *Ihh* frühzeitig induziert (C, D). Dagegen ist in der Ulna von *Ulnaless*-Gliedmaßen kein Effekt von Cyclopamin auf die *Ihh*-Expression zu erkennen (D, Pfeil). 50x Vergrößerung.

4.1.5 Retinsäure hat keinen Einfluss auf die Chondrogenese im Zeugopod von *Ulnaless*- und *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten

Retinsäure (RA) besitzt viele Funktionen während der Embryonalentwicklung. Bei der Entwicklung der Gliedmaßen reguliert RA die Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse durch Kontrolle der Expression von spezifischen *Hox*-Genen (Niederreither und Dolle, 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass *Hoxd13* die Expression des RA-synthetisierenden Enzyms *Retinaldehyde dehydrogenase 2* (*Raldh2*) aktiviert, und dass hohe Dosen von RA die Chondrogenese inhibieren (Desbiens et al., 1990; Kuss et al., 2009; Wedden et al., 1987). In *Ulnaless*-Vordergliedmaßen ist *Hoxd13* ektopisch in der Zeugopod-Region exprimiert (Herault et al., 1997). Daher sollte in *Ulnaless*- und *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen überprüft werden, ob eine gesteigerte RA-Produktion in der Zeugopod-Region der Mutanten zu finden ist. Diese könnte für die starke Größenreduktion von Ulna und Radius verantwortlich sein. Aufgrund dessen wurde die *Raldh2*-Expression mittels *Whole mount-in situ* Hybridisierung in den Vordergliedmaßen von E12.5 *Ulnaless*- und *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Embryonen analysiert.

In Gliedmaßen von E12.5 Wildtyp-Mäusen ist *Raldh2* nur im Mesenchym zwischen den Fingern exprimiert (Abb. 4.14A, C) (Niederreither et al., 1997). Im Vergleich zum Wildtyp wurde in E12.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Extremitäten eine erhöhte *Raldh2*-Expression ermittelt (Abb. 4.14A, B, Pfeil). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch eine verzögerte Entwicklung des mutanten Embryos zu erklären. Dennoch ist in *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten keine Änderung in der *Raldh2*-Expressionsdomäne zu erkennen. *Raldh2* ist nur im Mesenchym der Finger und nicht, wie vermutet, in der Zeugopod-Region der Mutanten exprimiert (Abb. 4.14B, D).

Demzufolge wurde kein Hinweis gefunden, dass eine erhöhte Retinsäure-Konzentration im Zeugopod der Mutanten das Wachstum von Ulna und Radius inhibiert.

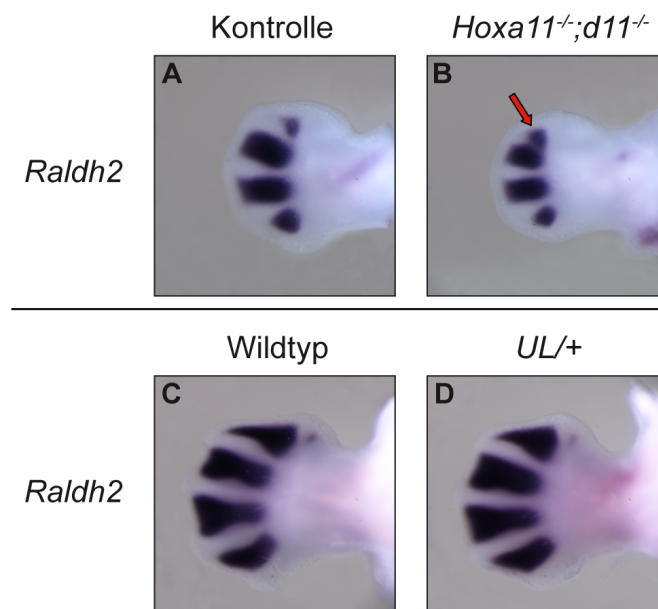


Abb. 4.14: Die Expression von *Raldh2* ist in E12.5 *Ulnaless*- und *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen unverändert. *In situ* Hybridisierung mit Dig-markierter antisense-Sonde für *Raldh2* auf E12.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- (B) und Kontrollembryonen (A) sowie *Ulnaless*- (D) und Wildtyp-Mäusen (C). In *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten ist wegen der verzögerten Entwicklung eine erhöhte *Raldh2*-Expression im interdigitalen Mesenchym zu sehen (B, Pfeil). Dagegen ist kein Unterschied in der *Raldh2*-Expression zwischen *Ulnaless*- und Wildtyp-Vordergliedmaßen zu erkennen (C, D). 80x Vergrößerung. Dorsale Ansicht.

4.1.6 Zellautonomer Defekt der Chondrozytendifferenzierung in der Ulna von *Ulnaless*-Vorderextremitäten

Der Defekt der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Embryonen kann durch externe oder intrinsische Faktoren hervorgerufen werden. Um zu klären, ob Faktoren von außen den Differenzierungsdefekt der Chondrozyten auslösen, wurden mesenchymale Zellen aus den Vordergliedmaßen von E12.5 *Ulnaless*-Embryonen isoliert und deren Differenzierung *in vitro* überprüft. Dazu wurden diese Zellen in hoher Dichte als Micromass-Kulturen ausgesät und die nach fünf Tagen in Kultur gebildeten Nodules mit Alcianblau gefärbt und anschließend gezählt.

In Micromass-Kulturen von *Ulnaless*-Mäusen wurde im Vergleich zu Kulturen aus Wildtyp-Embryonen eine signifikante Reduktion in der Anzahl der Alcianblau-gefärbten Nodules festgestellt (Abb. 4.15A, B). Zur statistischen Analyse wurde ein Histogramm erstellt, das zeigt, wie oft eine bestimmte Anzahl von Nodules in *Ulnaless*- und Wildtyp-Kulturen ermittelt wurde (Abb. 4.15C). Innerhalb der analysierten *Ulnaless*- bzw. Wildtyp-Kulturen differierte die Anzahl von Nodules deutlich. Dennoch ist zu erkennen, dass im Vergleich zu Wildtyp-Kulturen häufig eine geringere Anzahl von Nodules in *Ulnaless*-Kulturen ermittelt wurde. Insgesamt wurden neun *Ulnaless*- und fünfzehn Wildtyp-Embryonen in vier unabhängigen Experimenten analysiert. Daraus ergab sich eine Anzahl von 69 *Ulnaless*- und 92 Wildtyp-Kulturen, die mit Alcianblau gefärbt und anschließend gezählt wurden. Mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests wurde ein Signifikanz-Niveau von weniger als $p < 0,001$ ermittelt (Abb. 4.15C).

Die Analyse der Micromass-Kulturen zeigt, dass die primären Chondrozyten von *Ulnaless*-Vordergliedmaßen auch *in vitro* schlechter differenzieren als die Zellen des Wildtyps. Da die primären Chondrozyten in Micromass-Kulturen nicht in ihrem ursprünglichen Zellverband vorliegen, kann vermutet werden, dass der beobachtete Differenzierungsdefekt in *Ulnaless*-Kulturen nicht von äußeren Faktoren abhängt, sondern ein zellautonomer Effekt ist.

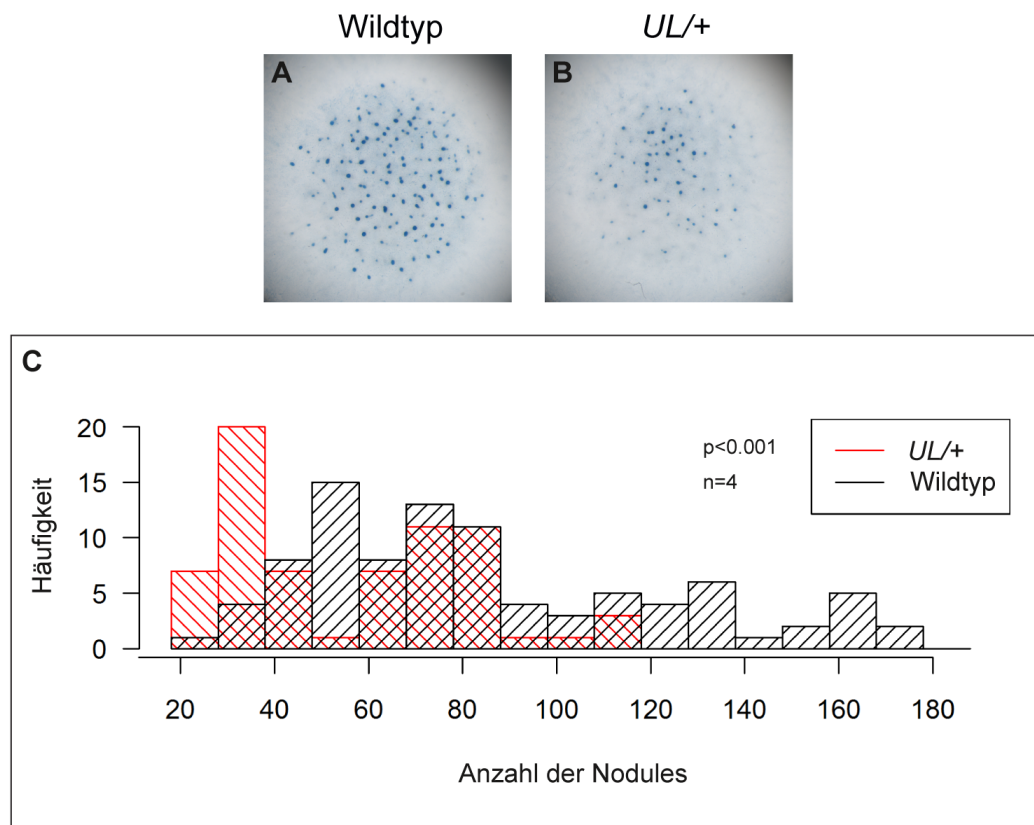


Abb. 4.15: Micromass-Kulturen von primären Chondrozyten aus E12.5 *Ulnaless*-Vorderextremitäten zeigen eine verringerte Differenzierung. Wildtyp- (A) und *Ulnaless*-Micromass-Kulturen (B) wurden nach fünf Tagen in Kultur mit Alcianblau gefärbt. Durch die Färbung wurden deutlich weniger Nodules in *Ulnaless*-Kulturen im Vergleich zu den Wildtyp-Kulturen ermittelt. Das Histogramm (C) zeigt die Häufigkeitsverteilungen, der in *Ulnaless*- und Wildtyp-Kulturen ermittelten Anzahl von Nodules. Die Verteilung der Anzahl von Nodules in *Ulnaless*-Kulturen ist gegenüber der in Wildtyp-Kulturen signifikant in Richtung einer geringeren Anzahl verschoben. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt ($n=4$). (Wilcoxon-Rangsummentest, $p < 0,001$). 32x Vergrößerung (A, B).

4.1.7 *Runx2* und *Shox2* sind putative Zielgene von *Hoxa11* und *Hoxd11*

Da der Defekt der Chondrozytendifferenzierung zellautonom zu sein scheint, sollte die Expression von Transkriptionsfaktoren untersucht werden, deren Mutation in Mäusen ebenfalls eine Störung der hypertrophen Differenzierung hervorruft. Aufgrund dessen wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Shox2* in E14.5 *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Vorderextremitäten analysiert.

Im Wildtyp des Stadiums E14.5 ist *Runx2* sowohl in prähypertrophen Chondrozyten als auch im Perichondrium exprimiert (Abb. 4.16A, G) (Kim et al., 1999). Die Expression des Homöobox-Transkriptionsfaktors *Shox2* ist dagegen in proliferierenden Chondrozyten beschrieben (Abb. 4.16D, J) (Yu et al., 2007).

Im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Vordergliedmaßen konnte weder eine Expression von *Runx2* noch von *Shox2* in den Chondrozyten nachgewiesen werden (Abb. 4.16B, C, E, F, H, I, K, Pfeile). Nur im Perichondrium wurde eine Expression von *Runx2* ermittelt (Abb. 4.16B, C, H, I, Pfeile).

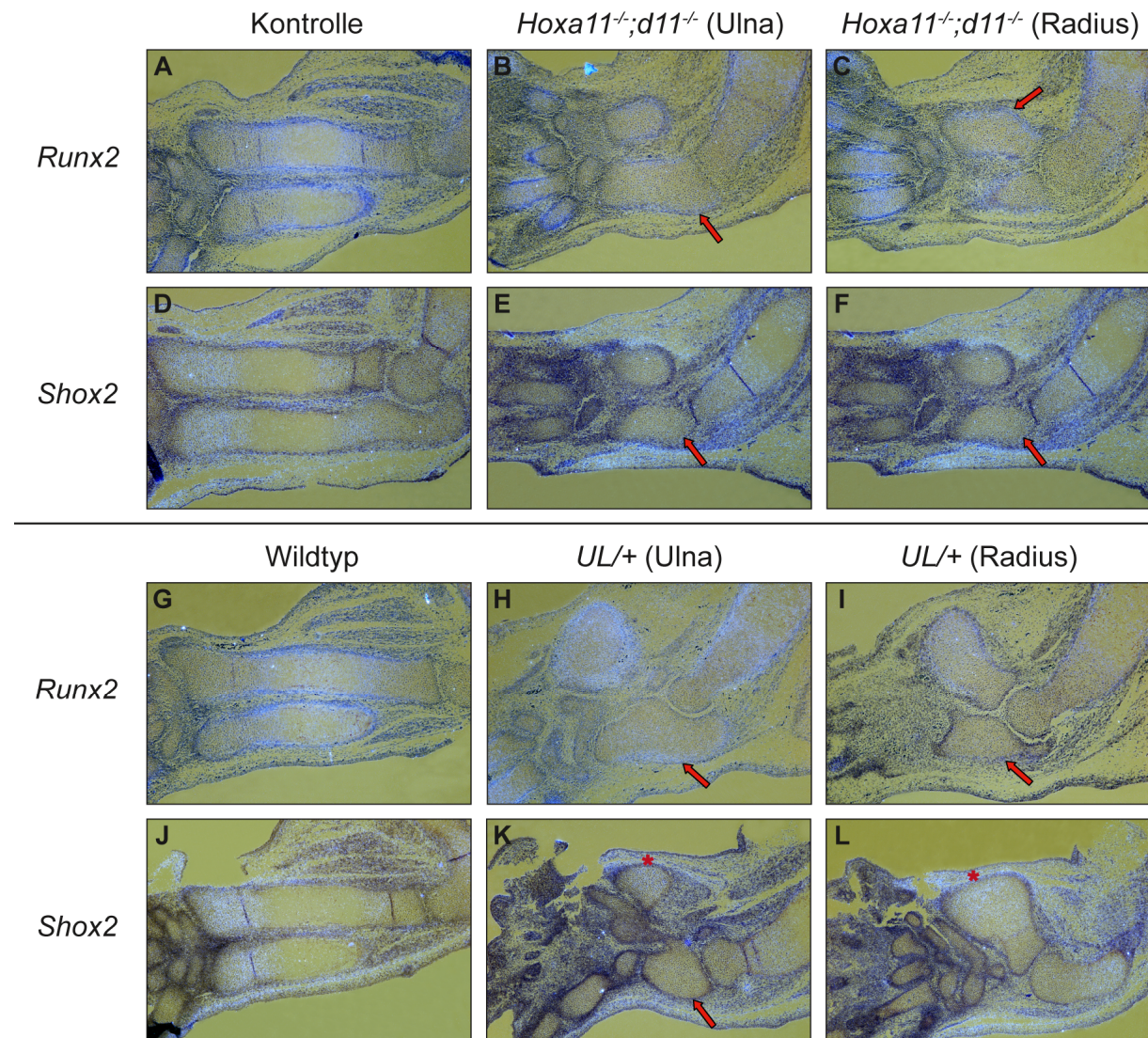


Abb. 4.16: *Runx2* und *Shox2* sind mögliche Zielgene von posterioren *Hox*-Genen. *In situ* Hybridisierung auf Schnitten von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vorderextremitäten (B, C, E, F), Kontrollgliedmaßen (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Vordergliedmaßen (G, J) mit antisense-Sonden für *Runx2* (A-C, G-I) und *Shox2* (D-F, J-L). Sowohl im Radius als auch in der Ulna von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten ist *Runx2* nur im Perichondrium exprimiert (B, C, siehe Pfeile). In der Ulna von *Ulnaless*-Gliedmaßen ist *Runx2* hingegen nur im posterioren Perichondrium exprimiert (H, I, siehe Pfeile). Im Radius von *Ulnaless*-Embryonen ist *Runx2* genauso wie im Wildtyp exprimiert (G-I). *Shox2* ist in Ulna und Radius der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Embryonen nicht nachweisbar (E, F, siehe Pfeile). In der Ulna von *Ulnaless*-Gliedmaßen ist ebenfalls keine *Shox2*-Expression zu sehen (K, siehe Pfeil). Hingegen wurde im Radius ein zum Wildtyp vergleichbares Expressionsmuster von *Shox2* ermittelt (J, L, siehe *). 80x Vergrößerung.

Der Verlust der *Runx2*-Expression in prähypertrophen Chondrozyten der Ulna und des Radius von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten und der Ulna von *Ulnaless*-Embryonen stimmt mit den *Ihh*-Expressionsdaten überein und bestätigt, dass in diesen Knorpelanlagen keine hypertrophe Differenzierung stattfindet. Des Weiteren zeigt der Verlust der *Runx2*- und *Shox2*-Expression, dass beide Gene *downstream* von posterioren *Hox*-Genen sind. Dies führt zu der Annahme, dass *Runx2* und *Shox2* putative Zielgene von *Hoxa11* und *Hoxd11* sind.

4.1.8 Die Ulna von *Ulnaless*-Gliedermaßen gleicht dem Olecranon

Die morphologische Analyse von E18.5 *Ulnaless*-Vorderextremitäten zeigte, dass in der Ulna die hypertrophen Chondrozyten kreisförmig in der Mitte der Ulna, umgeben von proliferierenden Chondrozyten, lokalisiert sind (Abb. 4.11F, Pfeil). Diese zirkuläre Anordnung der hypertrophen Chondrozyten ist untypisch für Röhrenknochen und wird vorwiegend in den Knochen des Carpus (Handwurzelknochen) beobachtet. Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten durch eine homöotische Transformation zu einem Handwurzelknochen umgewandelt wurde. Dazu wurde in der Ulna sowohl die Mineralisierung mittels von Kossa-Färbung als auch die Expression von Markern der Carpus-Knochen analysiert und die Ergebnisse mit denen der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten verglichen.

Die Mineralisierung verläuft in den Röhrenknochen von außen, ausgehend vom Perichondrium (Abb. 4.17A, D). Dagegen erfolgt sie in Handwurzelknochen und sekundären Ossifikationszentren von der Mitte der Knorpelanlage (Abb. 4.19A, Pfeile). In von Kossa-gefärbten E18.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vorderextremitäten wurde keine Mineralisierung des Perichondriums von Ulna und Radius nachgewiesen, sondern mineralisierte Matrix in der Region hypertropher Chondrozyten (Abb. 4.17B, C, Pfeile). In der Ulna von E18.5 *Ulnaless*-Gliedermaßen ist die Mitte der Knorpelanlage im Bereich hypertropher Chondrozyten mineralisiert. Das Perichondrium ist allerdings nicht kalzifiziert (Abb. 4.17E, Pfeil). Dieser Verlauf der Mineralisierung in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten gleicht somit eher der Mineralisierung in Handwurzelknochen als der in Röhrenknochen (Abb. 4.17E, Pfeil und Abb. 4.19A, Pfeile). Die histologischen Daten von E18.5 *Ulnaless*-Vorderextremitäten zeigen demnach, dass die Ulna Ähnlichkeiten zu einem Knochen des Carpus besitzt.

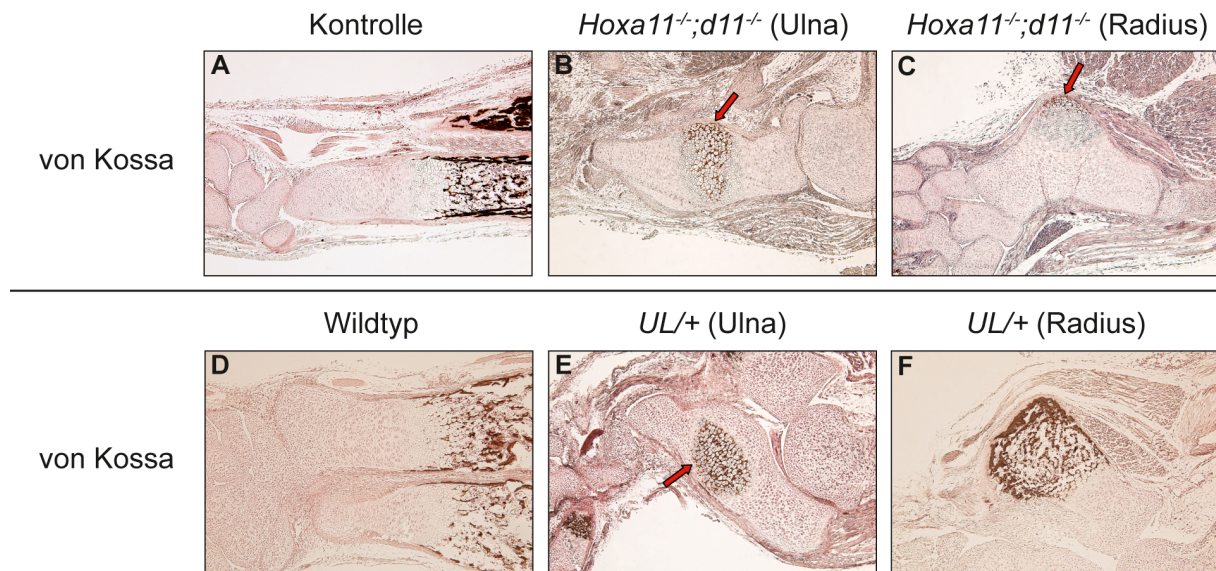


Abb. 4.17: Die Ulna von *Ulnaless*-Extremitäten mineralisiert im Stadium E18.5 wie ein Knochen des Carpus. Schnitte von E18.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen (B, C), Kontrollgliedmaßen (A) sowie *Ulnaless*- (E, F) und Wildtyp-Vorderextremitäten (D) wurden nach von Kossa gefärbt. In Ulna und Radius der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutante und in der Ulna von *Ulnaless*-Embryonen wurde kalzifizierte Matrix in der Region hypertropher Chondrozyten detektiert. Das Perichondrium wurde nicht mineralisiert (B, C, E, siehe Pfeile). In der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten ähnelt die Mineralisierung der in den Handwurzelknochen (E, Pfeil). Der Radius mineralisiert dagegen wie im Wildtyp (D, F). 80x Vergrößerung.

Um auf molekularer Ebene zu bestätigen, dass die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten Ähnlichkeiten zu einem Knochen des Carpus besitzt, wurde in *Ulnaless*-Vordergliedmaßen die Expression von verschiedenen Genen untersucht, die in der Region der Handwurzelknochen exprimiert sind. Die Expression dieser Gene wurde außerdem mit der Expression in *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Gliedmaßen verglichen.

Zur Expressionsanalyse wurde der *Growth differentiation factor 5* (*Gdf5*) herangezogen, der in Gliedmaßen des Wildtyps in den Gelenken und zwischen den Handwurzelknochen exprimiert ist (Abb. 4.18A, G, Pfeile) (Chang et al., 1994). Des Weiteren wurde eine *Col2a1*-antisense-Sonde verwendet, die ausschließlich das alternative Transkript für Typ-IIA-Prokollagen detektiert. Das Typ-II-Prokollagen wird in zwei Formen (Typ-IIA und Typ-IIB) synthetisiert, die sich durch eine Cystein-reiche, globuläre Domäne unterscheiden. Nur das Typ-IIA-Prokollagen besitzt diese Proteindomäne, die durch das Exon 2 kodiert wird. Beide Transkripte für Typ-II-Prokollagen sind nicht nur strukturell unterschiedlich, sondern auch in unterschiedlichen Regionen des Knorpels exprimiert (Nah et al., 2001). *Col2a1* (Typ-IIA) ist im Wildtyp besonders stark in den periartikulären Chondrozyten von Ulna und Radius sowie in der äußersten Zellschicht der Handwurzelknochen exprimiert, wodurch die Grenzen der Carpus-Knochen kennzeichnet werden

(Abb. 4.18D, J). Wenn die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten zu einem Knochen des Carpus homöotisch transformiert ist, sollte *Gdf5* im Mesenchym um die Ulna herum exprimiert sein und *Col2a1* (*Typ-IIA*) in der äußersten Zellschicht der Ulna. Allerdings ist *Gdf5* sowohl in E14.5 *Ulnaless*- als auch in *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vordergliedmaßen wie im Wildtyp zwischen den Handwurzelknochen und im Ellenbogengelenk exprimiert (Abb. 4.18A-C, G-I, Pfeile).

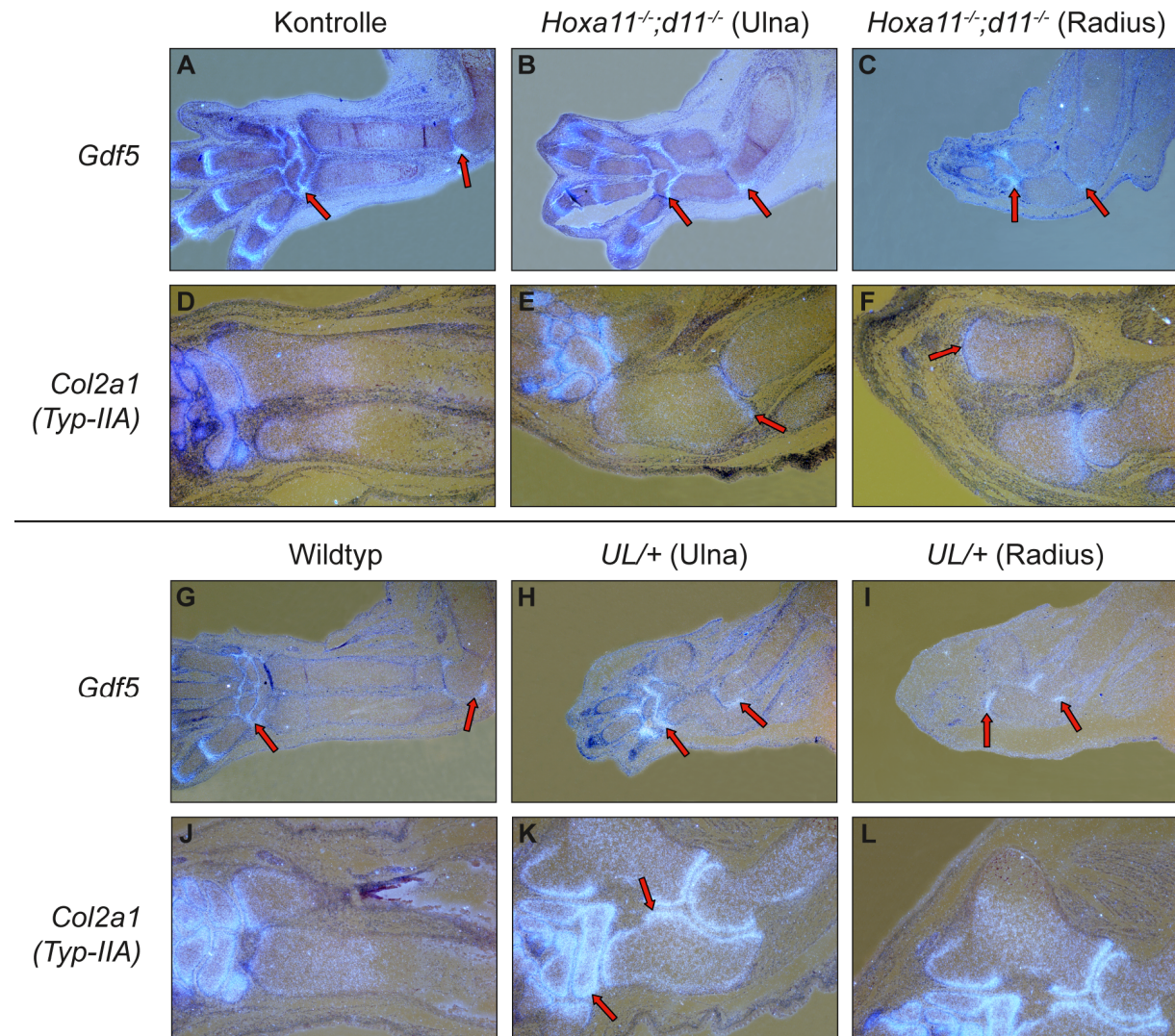


Abb. 4.18: Die Expression von Markern für Handwurzelknochen ist in der Ulna von *Ulnaless*-Gliedmaßen unverändert. *In situ* Hybridisierung auf E14.5 (A-C, G-I) und E16.5 (D-F, J-L) Schnitten von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Vorderextremitäten (B, C, E, F) und Kontrollgliedmaßen (A, D) sowie *Ulnaless*- (H, I, K, L) und Wildtyp-Vordergliedmaßen (G, J) mit antisense-Sonden für *Gdf5* (A-C, G-I) und *Col2a1* (*Typ-IIA*) (D-F, J-L). In E14.5 *Ulnaless*- und *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten ist *Gdf5* ähnlich wie im Wildtyp zwischen den Handwurzelknochen und im Ellenbogengelenk exprimiert (A-C, G-I, siehe Pfeile). Auch *Col2a1* (*Typ-IIA*) ist in Ulna und Radius von E16.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten unverändert zur Kontrolle exprimiert (D-F). In E16.5 *Ulnaless*-Mutanten ist *Col2a1* (*Typ-IIA*) an der anterioren Seite der Ulna in periartikulären Chondrozyten exprimiert (K, siehe Pfeil), während die *Col2a1* (*Typ-IIA*)-Expression im Radius der Expression im Wildtyp gleicht (J, L). *Gdf5*: 50x Vergrößerung, *Col2a1* (*Typ-IIA*): 80x Vergrößerung.

Die Expression von *Col2a1* (*Typ-IIA*) wurde in der Ulna von E16.5 *Ulnaless*-Mutanten ebenfalls wie in den Extremitäten des Wildtyps und der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutanten in periartikulären Chondrozyten nachgewiesen (Abb. 4.18D-F, J-L, Pfeile). Demnach wurde durch diese molekulare Analyse kein Hinweis auf eine homöotische Transformation der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten zu einem Handwurzelknochen gefunden.

Die morphologische Analyse von postnatalen *Ulnaless*-Vorderextremitäten sollte schließlich letzte Hinweise auf eine homöotische Transformation der Ulna zu einem Knochen des Carpus liefern. Durch von-Kossa-Färbung wurde in der Ulna von postnatalen P6 *Ulnaless*-Mäusen im Vergleich zur Ulna in E18.5 *Ulnaless*-Embryonen eine deutliche Änderung in der Struktur des mineralisierten Gewebes beobachtet. In der Ulna von P6 *Ulnaless*-Mutanten sind bereits Trabekel zu erkennen. Außerdem ist nun das posteriore Perichondrium der Ulna mineralisiert (Abb. 4.19B). Die Mineralisierung in der Ulna von P6 *Ulnaless*-Mutanten gleicht demnach der in Ulna und Radius des Wildtyps (Abb. 4.19A, B). Die Safranin-Weigert-Färbung bestätigt, dass im Stadium P6 in der Ulna von *Ulnaless*-Vordergliedmaßen eine zum Wildtyp vergleichbare Wachstumsfuge vorhanden ist. In diesem Stadium sieht die Ulna von P6 *Ulnaless*-Mäusen nicht wie ein Knochen des Carpus aus, sondern wie das Olecranon des Wildtyps (Abb. 4.19D, E).

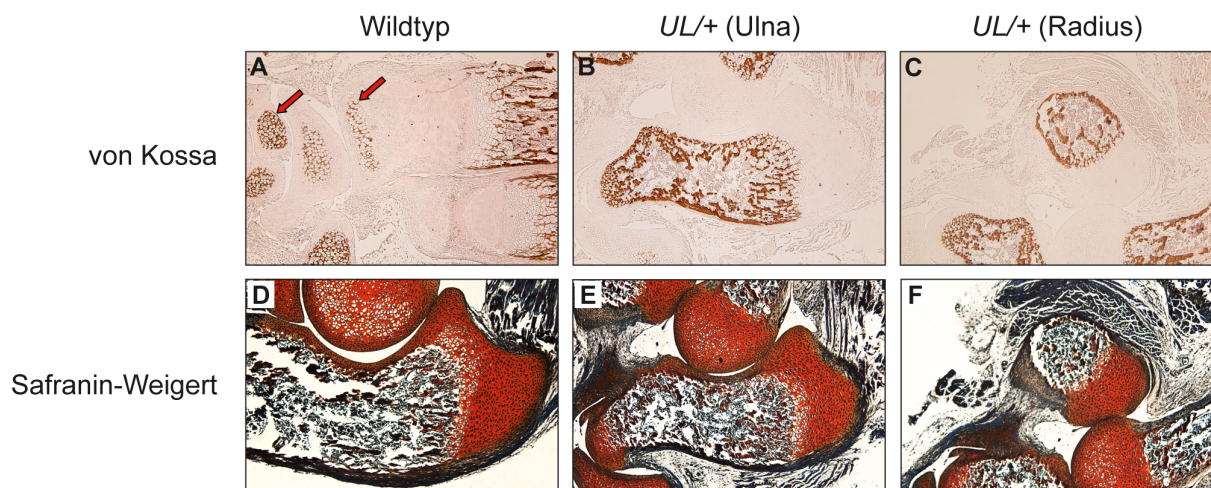


Abb. 4.19: Die Ulna von P6 *Ulnaless*-Gliedermaßen gleicht dem Olecranon im Wildtyp. Von Kossa- (A-C) und Safranin-Weigert-gefärbte (D-F) Schnitte von Vordergliedmaßen der postnatalen P6 *Ulnaless*-Mutanten (B, C, E, F) und des Wildtyps (A, D). Die Ulna von *Ulnaless*-Gliedermaßen mineralisiert in diesem Stadium nicht wie ein Carpus-Knochen (A, B). Stattdessen zeigt die Ulna eine korrekt angelegte Wachstumsfuge, die dem Olecranon im Wildtyp ähnelt (D, E). Der Radius von *Ulnaless*-Gliedermaßen differenziert und mineralisiert wie im Wildtyp (A, C, D, F). 80x Vergrößerung.

Die Analyse der Mineralisierung und Morphologie der Ulna von postnatalen P6 *Ulnaless*-Gliedmaßen deutet darauf hin, dass die Ulna nicht zu einem Handwurzelknochen homöotisch transformiert ist. Stattdessen gleicht die Ulna dem proximalen Ende der Ulna im Wildtyp, dem Olecranon.

4.1.9 Kompensation von *Hoxa11* und *Hoxd11* in den Hintergliedmaßen von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten durch erhöhte *Hoxc11*-Expression

Paraloge *Hox*-Gene besitzen hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten und daher die Fähigkeit der funktionellen Kompensation. Diese wird deutlich, wenn die gleichzeitige Inaktivierung mehrerer *Hox*-Gene einer paralogen Gruppe zu einem stärkeren Phänotyp führt als in den Einzelmутanten. Ein Beispiel hierfür sind die *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten, die äußerst verkürzte Vordergliedmaßen aufweisen (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995). Diese Mutanten besitzen somit einen stärkeren Phänotyp als homozygote Mäuse für die individuellen Mutationen, die keine Reduktion der Gliedmaßen zeigen (Davis und Capecchi, 1994; Small und Potter, 1993).

Das einzige *Hox*-Gen der paralogen *Hox11*-Gruppe, das in *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mäusen nicht mutiert ist, ist *Hoxc11*. Um eine mögliche Kompensation der *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutation durch ektopisches *Hoxc11* zu identifizieren, sollte die Expression von *Hoxc11* in Vorder- und Hintergliedmaßen von E11.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten untersucht werden. *Hoxc11* ist im Wildtyp ausschließlich in Hintergliedmaßen exprimiert (Abb. 4.20B) (Hostikka und Capecchi, 1998).

In *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Doppelmutanten, konnte keine ektopische *Hoxc11*-Expression in den Vordergliedmaßen detektiert werden (Abb. 4.20C). In den Hintergliedmaßen wurde allerdings eine nach distal und anterior vergrößerte *Hoxc11*-Expressionsdomäne nachgewiesen (Abb. 4.20D). Demnach wurde ein Hinweis gefunden, dass *Hoxc11* den Verlust von *Hoxa11* und *Hoxd11* in den Hintergliedmaßen von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-}-Mutanten kompensiert, wodurch im Vergleich zu den Vorderextremitäten ein schwächerer Phänotyp in den Hintergliedmaßen resultiert.

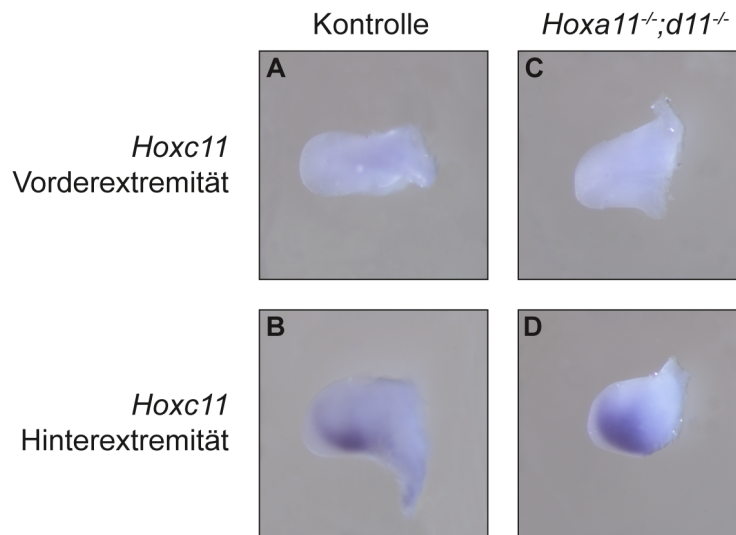


Abb. 4.20: Die erhöhte *Hoxc11*-Expression in *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Hintergliedmaßen kompensiert den Verlust von *Hoxa11* und *Hoxd11*. *In situ* Hybridisierung auf E11.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- (C, D) und Kontrollembryonen (A, B) mit Dig-markierter antisense-Sonde für *Hoxc11*. Es wurde keine Expression von *Hoxc11* in *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Vordergliedmaßen nachgewiesen (C). In den Hintergliedmaßen der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Doppelmutante ist die Expressionsdomäne von *Hoxc11* jedoch im Vergleich zur Kontrolle vergrößert (D). 80x Vergrößerung.

4.2 Identifikation von Enhancern und Transkriptionsfaktoren zur Regulation der *Ihh*-Expression

Aufgrund der Schlüsselrolle von *Ihh* während der enchondralen Ossifikation ist es von entscheidender Bedeutung, die Mechanismen aufzuklären, welche die Expression von *Ihh* regulieren. Dazu sollten mit Hilfe von transgenen Mäusen Enhancer in der 5'Sequenz von *Ihh* lokalisiert werden, welche die Expression von *Ihh* in den Gliedmaßen regulieren. Des Weiteren sollte mit Hilfe des Hefe-Ein-Hybrid Systems und eines Luciferase-Assays Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die die Expression von *Ihh* regulieren können.

4.2.1 Identifikation von konservierten Bereichen in der 5'Region von *Ihh*

Zur Identifikation von Enhancern, die die Expression von *Ihh* in den Gliedmaßen aktivieren, wurde der 5'Bereich von *Ihh* bis zu dem Gen *nonhomologous end-joining factor 1* (*Nhej1*) sowie das erste Intron von *Ihh* untersucht. Zunächst wurden diese genomischen Sequenzen mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (Assembly Feb. 2006) auf konservierte Regionen untersucht (Abb. 4.21). Je höher

die Konservierung ist, desto wahrscheinlicher ist das Vorhandensein eines regulatorischen Elements.

Durch den Vergleich der genomischen Sequenzen verschiedener Spezies in den genannten Bereichen konnten konservierte Elemente zwischen Maus, Ratte, Mensch, Hund, Opossum, Huhn, Xenopus und Tetraodon ermittelt werden. Besonders hoch konservierte Regionen befinden sich sowohl in der 5'Region von *Ihh*, in den Bereichen -25 bis -440, -10.100 bis -11.400 und -13.000 bis -13.400 relativ zum transkriptionellen Startpunkt, als auch im ersten Intron von *Ihh* (Abb. 4.21 und Abb. 4.22).

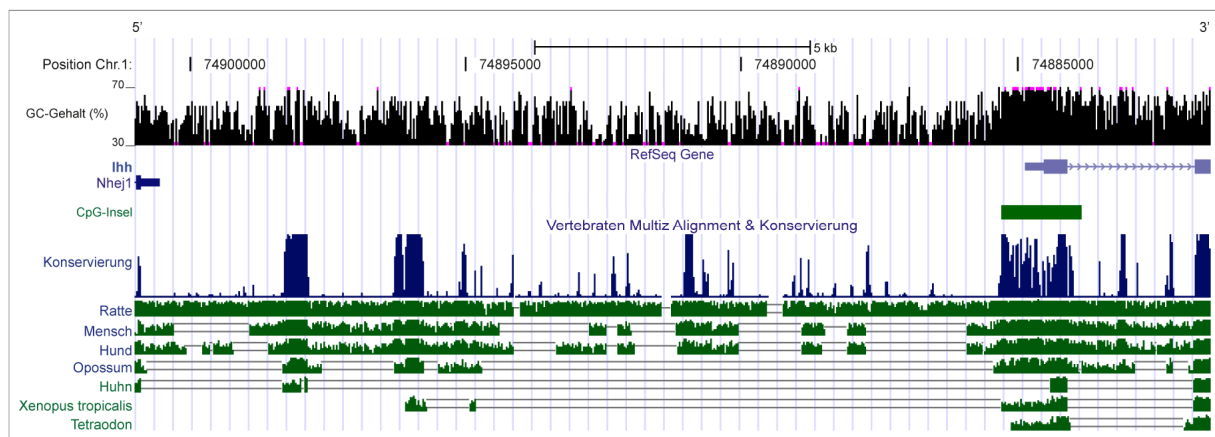


Abb. 4.21: Vergleich der genomischen Sequenzen des 5'Bereichs und des ersten Introns von *Ihh* verschiedener Spezies. Die analysierte, genomische Sequenz umfasste 16 kb des 5'Bereichs von *Ihh* bis zum Gen *Nhej1* sowie das erste Intron von *Ihh*. Es konnten mehrere konservierte Bereiche zwischen Maus, Ratte, Mensch, Hund, Opossum, Huhn, Xenopus und Tetraodon detektiert werden. Die Analyse wurde mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (Assembly Feb. 2006) durchgeführt.

Anhand der konservierten Elemente wurden die Fragmente Intron, T1, T3, und T5 für die weiteren *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Identifikation von Enhancern ausgewählt. Das Fragment Y1H sollte mit Hilfe des Hefe-Ein-Hybrid Systems auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht werden (Abb. 4.22).

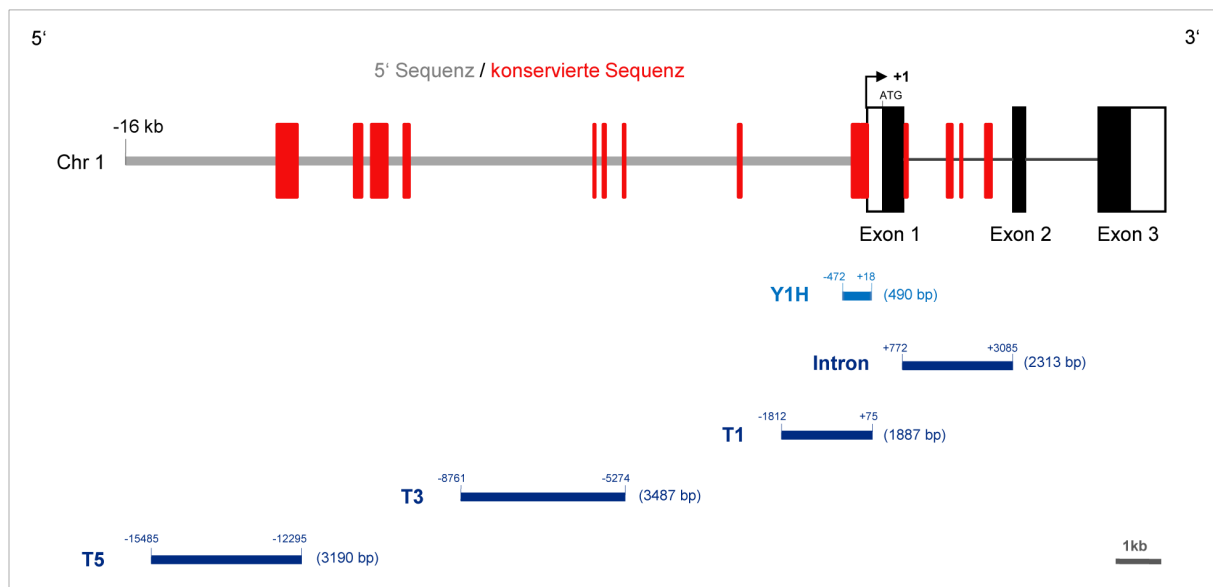


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der 5'Region von *Ihh* mit konservierten Bereichen. Aufgeführt sind die verschiedenen Fragmente, die auf Enhancer-Aktivität überprüft werden sollten und deren Lokalisation in der genomischen 5'Sequenz bzw. innerhalb von *Ihh*. Die Analyse der Fragmente T1, T3, T5 und Intron erfolgte mit Hilfe transgener Embryonen und in Luciferase-Expressionsstudien. Mit dem Fragment Y1H wurde ein Hefe-Ein-Hybrid System durchgeführt, um Transkriptionsfaktoren zu ermitteln, die an diese Sequenz binden können.

4.2.2 Regulation der *Ihh*-Expression *in vivo*

Zur Identifikation von Enhancern, die die Expression von *Ihh* in den prähypertrophen Chondrozyten der Gliedmaßen *in vivo* regulieren, wurden die zu analysierenden DNA-Fragmente (Intron, T1, T3, T5) (Abb. 4.22) zunächst in den pGZ40-Vektor (Abb. 3.3) kloniert. Mit diesen Konstrukten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Waldschütz und Wojtek Wegrzyn (Universitätsklinikum Essen) transgene Mausembryonen generiert und die Enhancer-Aktivität mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens nachgewiesen. Wenn die analysierte Sequenz als Enhancer von *Ihh* fungiert, sollte das *lacZ*-Reportergen in den Expressionsdomänen von *Ihh*, wie den prähypertrophen Chondrozyten der Gliedmaßen, exprimiert werden. Durch X-Gal-Färbung können die *lacZ*-exprimierenden Zellen dann blau gefärbt werden. Zur Analyse der transgenen Embryonen wurde das Embryonalstadium E14.5 gewählt, da in diesem Stadium *Ihh* stark in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert ist. Für jedes Enhancer-pGZ40-Konstrukt wurden mehrere Pronukleus-Injektionen durchgeführt, durch die je nach Reporter-Konstrukt eine unterschiedliche Anzahl an transgenen Embryonen generiert wurden (Tab. 2).

Tab. 2: Anzahl der untersuchten Embryonen pro Enhancer-pGZ40-Konstrukt.

Injiziertes Reporter-Konstrukt	Gesamtzahl der Embryonen	Anzahl transgener Embryonen
Intron-pGZ40	22	4
T1-pGZ40	48	9
T3-pGZ40	20	8
T5-pGZ40	11	2

Die X-Gal-Färbung lieferte sowohl in den transgenen Embryonen eines Enhancer-pGZ40-Konstrukts als auch in allen untersuchten, transgenen Embryonen unterschiedliche Färbemuster. Außerdem waren in keinem der transgenen Embryonen die prähypertrophen Chondrozyten der Gliedmaßen gefärbt (Abb. 4.23A). In Abb. 4.23 ist beispielhaft jeweils ein X-Gal-gefärbter, transgener Embryo pro Enhancer-pGZ40-Konstrukt dargestellt (restliche transgene Embryonen s. Kapitel 9). Embryo Intron-10 wies eine X-Gal-Färbung in der Nase auf, während Embryo T1-21 in distinkten Bereichen der Haut sowie oberhalb der Riechkolben gefärbt war. In Embryo T3-20 wurden dagegen das Gehirn und das Neuralrohr gefärbt. Die transgenen Embryonen, die mit dem T5-pGZ40-Konstrukt generiert wurden, zeigten keine Färbung. Zur Kontrolle der X-Gal-Färbung wurden ebenfalls nicht-transgene Embryonen gefärbt, in denen jedoch keine spezifische Färbung erzielt wurde (Abb. 4.23A). Damit ausgeschlossen werden kann, dass die negative Färbung der prähypertrophen Chondrozyten durch eine nicht ausreichende Penetrierung des Gewebes mit der X-Gal-Färbelösung resultierte, wurde zusätzlich eine *in situ* Hybridisierung auf parallelen Schnitten von Hintergliedmaßen der transgenen Embryonen mit radioaktiv-markierten antisense-Sonden für *lacZ* und *Ihh* durchgeführt. Mit der *in situ* Hybridisierung konnte bestätigt werden, dass das *lacZ*-Reportergen nicht in der Expressionsdomäne von *Ihh* exprimiert ist (Abb. 4.23B, Pfeile). Zur Überprüfung der verwendeten *lacZ*-Sonde wurden Vordergliedmaßen von heterozygoten E14.5 *Ptch1-LacZ*-Mäusen mit der *lacZ*-Sonde hybridisiert. Die Expression von *lacZ* konnte in diesen Mäusen wie erwartet in der *Ptch1*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden (Abb. 4.23B, Pfeile). Die verwendete *lacZ*-Sonde war demzufolge funktional.

Anhand der vorliegenden Daten wurde gezeigt, dass *in vivo* keine der analysierten Fragmente als Enhancer von *Ihh* in prähypertrophen Chondrozyten fungiert. Des Weiteren wurde kein Hinweis auf einen anderen Gewebe-spezifischen Enhancer von *Ihh* gefunden, da die vermeintlich spezifischen X-Gal-Färbungen anderer

Gewebe nicht mehrfach auftraten. Für die analysierten Fragmente Intron, T1, T3, T5 konnte demnach *in vivo* keine Enhancer-Aktivität bestätigt werden.

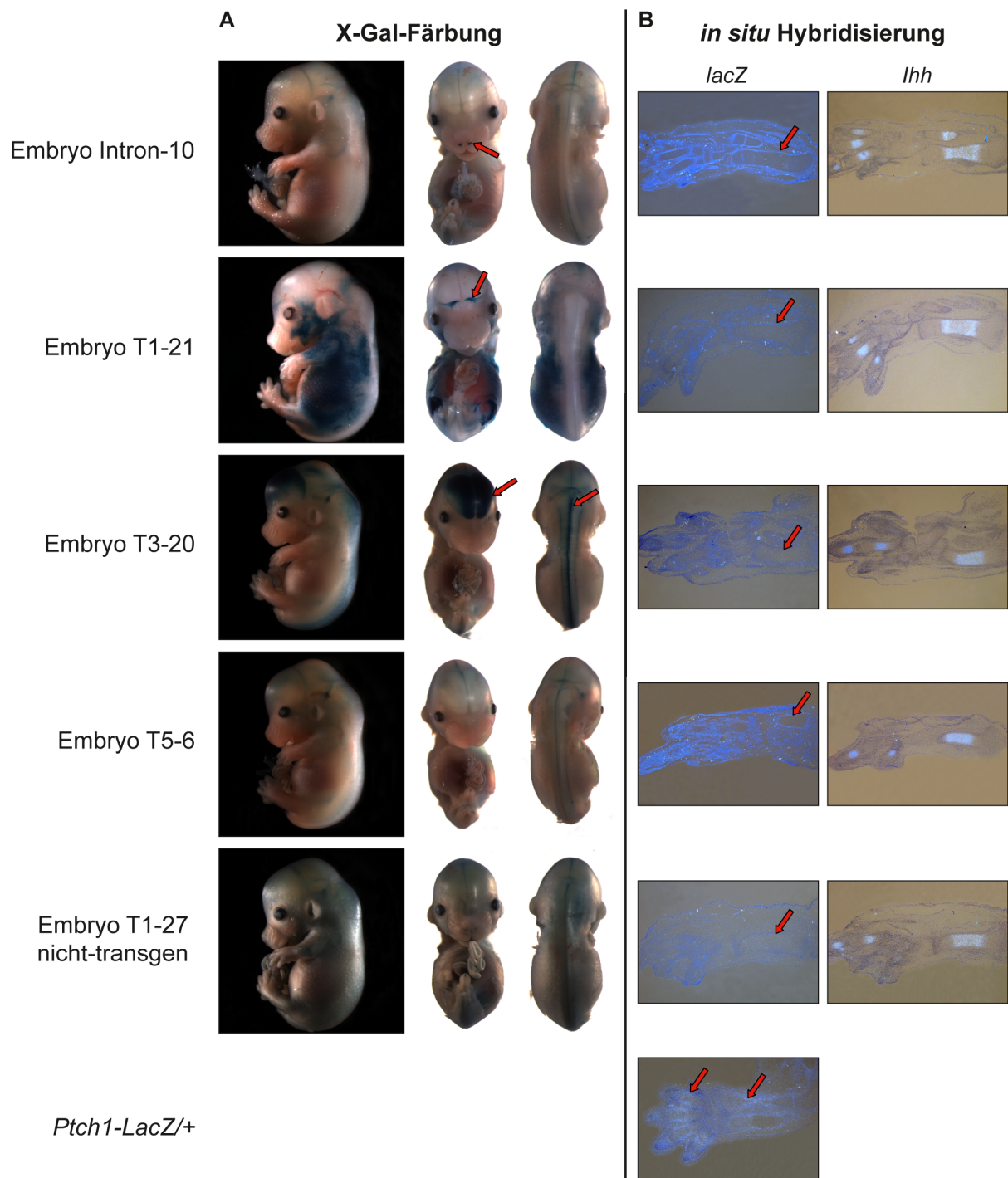


Abb. 4.23: Die analysierten Sequenzen zeigen keine *Ihh*-Enhancer-Aktivität *in vivo*. Die Embryonen Intron-10, T1-21 und T3-20 zeigten unterschiedliche Regionen, in denen *lacZ* exprimiert war. In diesen Embryonen wurde eine X-Gal-Färbung in der Nase (Intron-10, siehe Pfeil), in der Haut und oberhalb der Riechkolben (T1-21, siehe Pfeil) sowie im Gehirn und Neuralrohr (T3-20, siehe Pfeile) nachgewiesen. Der Embryo T5-6 zeigte wie der nicht-transgene Embryo T1-27 keine Färbung. Sowohl durch X-Gal-Färbung der transgenen Embryonen (A) als auch durch *in situ* Hybridisierung auf deren Hintergliedmaßen (B) konnte keine *lacZ*-Expression in der *Ihh*-Expressionsdomäne, in prähypertrophen Chondrozyten, nachgewiesen werden (B, siehe Pfeile). A: 12,5x Vergrößerung, B: 50x Vergrößerung.

4.2.3 Regulation der Expression von *Indian Hedgehog in vitro*

Zur Identifikation von Enhancern, die die Expression von *Ihh in vitro* regulieren können, wurden zunächst die zu analysierenden DNA-Fragmente (Intron, T1, T3, T5) (Abb. 4.22) in den pGL4.23-Vektor (Abb. 3.4) kloniert. Daraufhin wurden diese Vektoren in mesenchymale Zellen transfiziert und nach 48 Stunden die relative *Firefly*-Aktivität in den Proben ermittelt. Nur durch die Transfektion von mesenchymalen Zellen mit dem T1-pGL4.23-Konstrukt konnte eine erhöhte *Firefly*-Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.24A). Für die anderen Enhancer-pGL4.23-Konstrukte wurde eine basale Aktivität der *Firefly*-Luciferase ermittelt (Abb. 4.24B-D). Demnach kann *in vitro* nur das T1-Fragment als Enhancer fungieren.

Schließlich sollte der Einfluss verschiedener Homöobox-Transkriptionsfaktoren auf den T1-Enhancer in mesenchymalen Zellen untersucht werden. Die Kotransfektion des T1-pGL4.23-Konstrukts mit einem Runx2-Expressionsvektor diente als positiv-Kontrolle, da bereits bekannt ist, dass Runx2 an die T1-Enhancer-Sequenz bindet und die Expression von *Ihh* regulieren kann (Yoshida et al., 2004). Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Enhancer-Aktivität des T1-Fragments durch Runx2 um das 16fache erhöht (Abb. 4.24A). Durch die Kotransfektion von SHOX oder SHOX2 mit dem T1-pGL4.23-Konstrukt wurde ebenfalls eine signifikante Verstärkung der T1-Enhancer-Aktivität ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle wurde diese um das Zweifache mit SHOX2 und um das Dreifache mit SHOX erhöht (Abb. 4.24A). Im Gegensatz dazu reprimierten die Transkriptionsfaktoren HOXA9, Hoxa11 und Hoxd11 den T1-Enhancer (Abb. 4.24A). Eine weitere Repression der T1-Enhancer-Aktivität erfolgte durch BMP2-Behandlung. Im Vergleich zur Kontrolle wurde durch BMP2-Behandlung eine 0,6fache Reduktion der relativen *Firefly*-Aktivität festgestellt (Abb. 4.24A). Die anderen putativen Enhancer-Bereiche wurden mit den gleichen Expressionsvektoren in mesenchymale Zellen kotransfiziert. Allerdings wurde für diese putativen Enhancer keine Änderung der basalen *Firefly*-Aktivität ermittelt (Abb. 4.24B-D). Ausschließlich HOXA9 bewirkte sowohl mit dem T1-Enhancer (Abb. 4.24A) als auch mit den putativen Enhancern Intron, T3 und T5 eine Reduktion der *Firefly*-Aktivität (Abb. 4.24B-D).

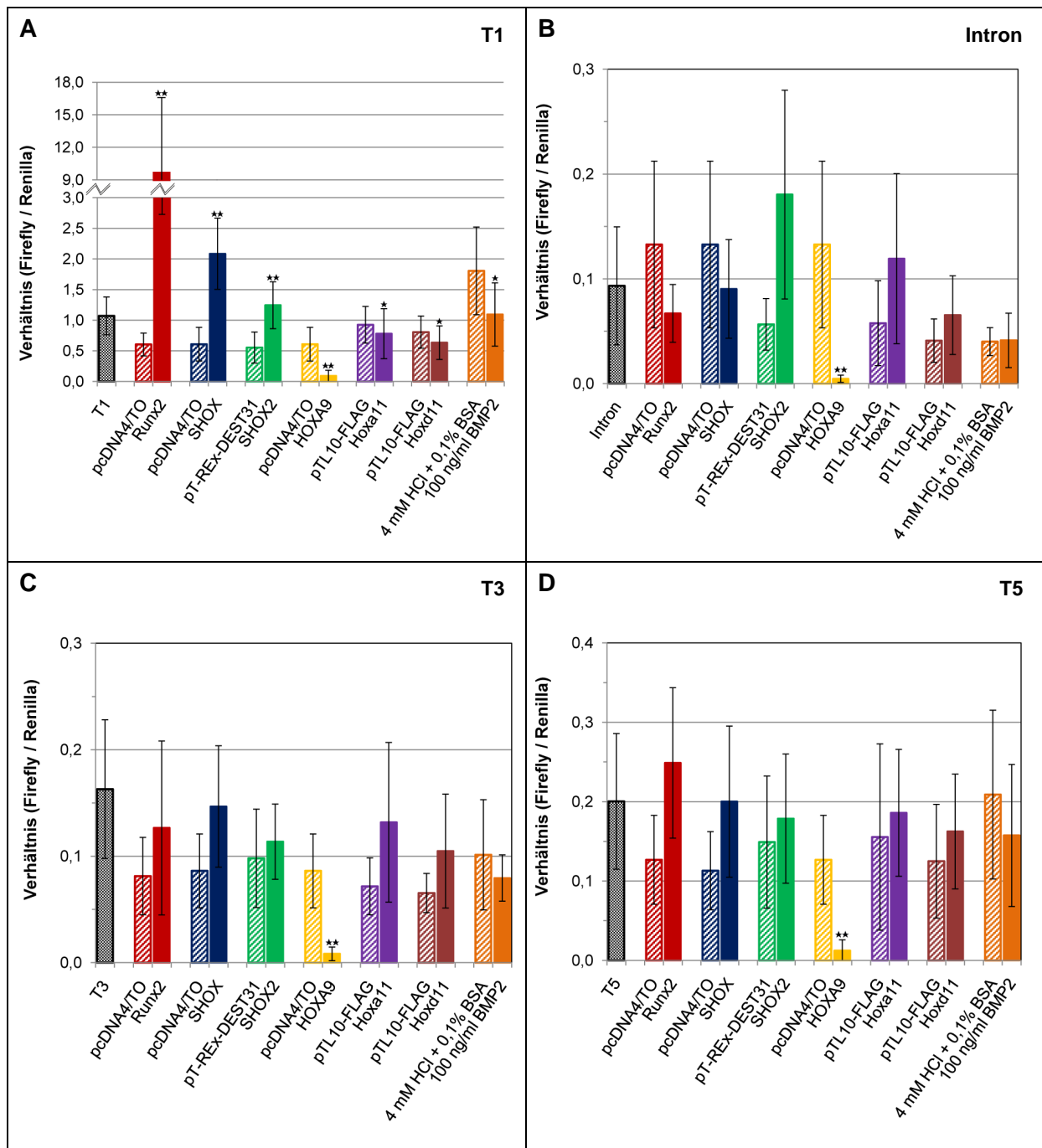


Abb. 4.24: Regulation der *Ihh*-Enhancer-Elemente in mesenchymalen Zellen. Mesenchymale Zellen aus E12.5 Wildtyp-Gliedmaßen wurden mit T1- (A), Intron- (B), T3- (C) oder T5-pGL4.23 (D) sowie angegebenen Expressionsvektoren kotransfiziert. Nur durch Transfektion von T1-pGL4.23 wurde eine Enhancer-Aktivität ermittelt, die durch Runx2, SHOX und SHOX2 weiter gesteigert wurde. Eine Reduktion der T1-Enhancer-Aktivität wurde durch HOXA9, Hoxa11, Hoxd11 und BMP2 erzielt. Die basale *Firefly*-Aktivität wurde durch Kotransfektion der anderen Enhancer-pGL4.23-Konstrukte mit den Expressionsvektoren nicht geändert. Ausschließlich HOXA9 zeigte bei allen Enhancer-Konstrukten eine starke Repression der *Firefly*-Aktivität. Die dargestellten Werte wurden durch Normalisierung der *Firefly*-Luciferase Aktivität zur *Renilla*-Luciferase-Aktivität ermittelt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass nur das T1-Fragment *in vitro*, in mesenchymalen Zellen, als Enhancer fungieren kann. Diese Enhancer-Aktivität konnte durch die Homöobox-Transkriptionsfaktoren SHOX und SHOX2 gesteigert werden. Eine starke Repression erfolgte durch HOXA9. Hoxa11 und Hoxd11 erzielten dagegen nur eine schwache Repression. Weiterhin konnte, wie bereits in der Literatur beschrieben, der T1-Enhancer durch Runx2 aktiviert werden.

4.2.4 MMP3 ist ein putativ regulatorisches Protein der *lhh*-Expression

Zur Identifikation von regulatorischen Proteinen der *lhh*-Expression, die an das 490 bp große Y1H-Fragment (Abb. 4.22) binden können, wurde ein Hefe-Ein-Hybrid System durchgeführt. Der pHIS2-Vektor (Abb. 3.2), der das Y1H-Fragment enthält (Y1H-pHIS2), wurde verwendet, um eine cDNA-Bibliothek aus humanen Chondrozyten auf interagierende Proteine zu untersuchen. Diese cDNA-Bibliothek ist in den pACT2-Vektor (Abb. 3.2) kloniert worden, der eine Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) mit den Proteinen, die die cDNA-Bibliothek kodiert, herstellt. Nach Kotransformation des Y1H-pHIS2-Vektors und der cDNA-Bibliothek in den Hefestamm Y187 können positive Protein-DNA-Interaktionen festgestellt werden, indem die transformierte, Histidin-auxotrophe Hefe auf Histidin-Mangelmedium ausplattiert wird. Die Interaktion eines GAL4-AD-Fusionsproteins mit dem Y1H-Fragment in dem Y187-Hefestamm führt zur Aktivierung der Expression des Reportergens *HIS3*, wodurch das Histidin-Biosynthese-Enzym IGP Dehydratase produziert wird, welches von der Hefe selbst nicht synthetisiert werden kann. Dadurch kann die transformierte Hefe wieder selbst Histidin synthetisieren und somit auf His-Mangelmedium wachsen.

Bestimmung der optimalen Konzentration von 3-Amino-1, 2, 4-triazol

Durch den Minimalpromotor des Y1H-pHIS2-Vektors erfolgt eine basale Expression des Reportergens *HIS3*. Aufgrund dessen ist auch bei einer fehlenden Interaktion des GAL4-AD-Fusionsproteins mit dem Y1H-Fragment ein Wachstum der Hefe auf His-Mangelmedium möglich. Damit das Wachstum falsch positiver Hefe-Klone unterdrückt wird, muss bei der Durchführung des Hefe-Ein-Hybrid Systems der Inhibitor 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) eingesetzt werden. Diese chemische Substanz inhibiert kompetitiv das Histidin-Biosynthese-Enzym IGP Dehydratase, das durch *HIS3* kodiert wird (Kishore und Shah, 1988). Bei positiver Interaktion wird das

HIS3-Gen verstärkt exprimiert, wodurch mehr IGP Dehydratase produziert wird und somit die Inhibition des Hefe-Wachstums aufgelöst wird. Trotz 3-AT-Konzentration im His-Mangelmedium erfolgt dann ein Wachstum von positiven Hefe-Klonen.

Zur Bestimmung der optimalen 3-AT-Konzentration wurde der Hefestamm Y187 mit dem Y1H-pHIS2-Vektor transformiert und auf SD-His/-Trp-Mangelmedium mit unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen ausplattiert. Es wurden mehrere Testreihen durchgeführt, in denen eine 3-AT-Konzentration von 20-200 mM im SD-His/-Trp-Mangelmedium ausgetestet wurde. Durch Auszählen wurde festgestellt, dass erst ab einer Konzentration größer 160 mM 3-AT ein Wachstum der Hefe signifikant reduziert werden konnte (Abb. 4.25). Deshalb wurde zur Identifikation von regulatorischen Proteinen der *Ihh*-Expression 170 mM 3-AT im Hefe-Ein-Hybrid System eingesetzt, um das Wachstum von falsch positiven Hefe-Klonen auf His-Mangelmedium zu unterdrücken.

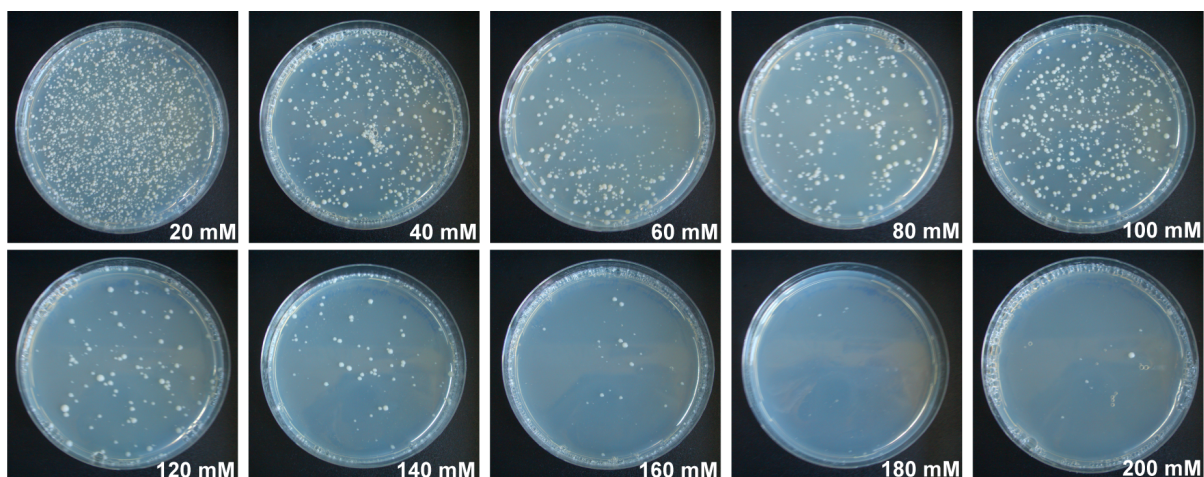


Abb. 4.25: Der Inhibitor 3-AT muss mit einer Konzentration von 170 mM eingesetzt werden. Der mit Y1H-pHIS2 transformierte Hefestamm Y187 wurde auf dem Mangelmedium SD-His/-Trp ausplattiert, das unterschiedliche Konzentrationen im Bereich von 20-200 mM 3-AT enthielt. Erst ab einer Konzentration größer 160 mM 3-AT konnte das Wachstum der Hefe stark reduziert werden.

Identifikation von positiven Klonen im Hefe-Ein-Hybrid System

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die mit der Y1H-Sequenz interagieren, wurde der Y1H-pHIS2-Vektor zusammen mit der cDNA-Bibliothek aus humanen Chondrozyten in den Hefestamm Y187 transformiert. Die transformierte Hefe wurde dann auf 170 mM 3-AT-haltigem SD-His/-Leu/-Trp-Mangelmedium ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Nur Hefe-Klone, die sowohl den Y1H-pHIS2-Vektor als auch ein Plasmid der cDNA-Bibliothek beinhalten und bei denen zusätzlich eine

Protein-DNA-Interaktion stattfindet, können auf dem Selektionsmedium SD-His/-Leu/-Trp + 170 mM 3-AT wachsen. Nach viertägiger Inkubation wurden die erhaltenen Hefe-Klone mehrfach auf frisches SD-His/-Leu/-Trp + 170 mM 3-AT-Medium überimpft, um falsch positive Klone zu eliminieren, da 3-AT bei Raumtemperatur instabil ist. Insgesamt wurden 62 Hefe-Klone isoliert. Diese wurden zunächst durch PCR auf die Größe der enthaltenen cDNAs aus der cDNA-Bibliothek überprüft. Die PCR zeigte, dass diese cDNAs überwiegend größer als 1 kb sind (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die cDNAs wahrscheinlich in voller Länge in den Klonen vorliegen. Zur Identifikation der cDNAs in den Hefe-Klonen wurde eine Sequenzierung durchgeführt (Sequenzierungsergebnisse s. Kapitel 9). Hauptsächlich wurden cDNA-Sequenzen ermittelt, die nicht im Leserahmen der GAL4-Aktivierungsdomäne waren. Außerdem wurde manchmal nur die 3'UTR-Region eines Gens in dem Plasmid detektiert. Des Weiteren wurden kodierenden Sequenzen für Proteine nachgewiesen, denen keine regulatorische Funktion auf Transkriptionsebene zugeschrieben wird. Auffällig war jedoch, dass in zwei Hefe-Klonen die kodierende Sequenz der Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3) nachgewiesen werden konnte. Humanes MMP3 wurde bereits als Transkriptionsaktivator in Chondrozyten beschrieben (Eguchi et al., 2008). Für MMP3 lag zwar eine Verschiebung des Leserahmens vor, allerdings ist das Auftreten einer translationalen Leserahmenverschiebung in der Hefe nicht selten (Matsufuji et al., 1996).

Nachweis des humanen MMP3-Proteins in positiven Hefe-Klonen

Zur Bestätigung der Translation von MMP3 in der Hefe wurde ein Protein-Extrakt aus den Hefe-Klonen hergestellt, die die MMP3-cDNA-Sequenz beinhalten. Durch SDS-Page und anschließendem Western Blot sollte überprüft werden, ob das MMP3-Protein in diesen Hefe-Klonen produziert wird. Im Protein-Extrakt von Klon Nr. 45 wurde sowohl mit einer 1:500 als auch 1:1000 Verdünnung von Anti-MMP3 zwei Banden auf der Höhe von circa 55 und 65 kDa im Western Blot detektiert (Abb. 4.26, Pfeile). Das theoretische Molekulargewicht der Pro-Proteine von MMP3 beträgt 57 kDa und 59 kDa, während aktive MMP3-Proteine ein theoretisches Molekulargewicht von 35 kDa und 45 kDa besitzen (Si-Tayeb et al., 2006). Für das GAL4-MMP3-Fusionsprotein ergibt sich demnach ein mögliches Molekulargewicht von 53 kDa, 63 kDa, 75 kDa oder 77 kDa. Laut Sequenzierung sollte in Klon Nr. 23 auch MMP3 vorliegen. MMP3 konnte im Protein-Extrakt dieses Klons allerdings nicht

nachgewiesen werden. Da die Protein-Konzentration des Haushaltsgens Aktin in allen Proben jedoch gleich war und somit die aufgetragene Gesamtproteinmenge in den verschiedenen Proben nicht variierte, wurde MMP3 in Klon Nr. 23 entweder nicht exprimiert oder die MMP3-Protein-Konzentration lag unter der Nachweisgrenze des Western Blots. Als negativ-Kontrolle wurden außerdem Protein-Extrakte von untransformierter Hefe sowie von Klon Nr. 8, in dem die kodierende Sequenz für Lumican vorlag, aufgetragen. Es wurden keine Banden in diesen Proben detektiert.

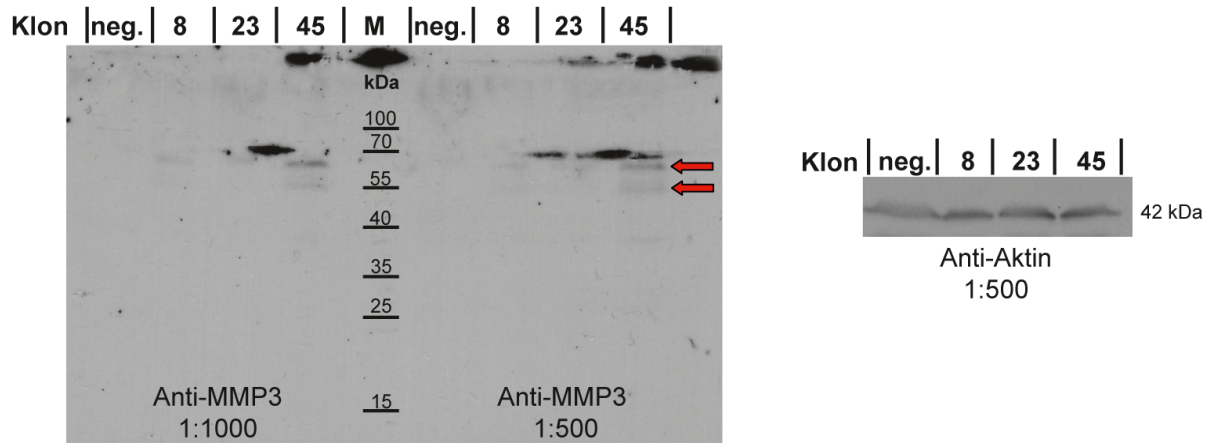


Abb. 4.26: Nachweis von humanem MMP3 in dem Hefe-Klon Nr. 45. In Protein-Extrakten des Klons Nr. 45 konnten zwei Banden von circa 55 und 65 kDa mit dem Anti-MMP3-Antikörper detektiert werden. In Klon Nr. 23 konnte keine MMP3-Bande nachgewiesen werden. Als negativ-Kontrolle diente das Protein-Extrakt aus untransformierter Hefe und aus Klon Nr. 8, der das Protein Lumican exprimieren sollte. Als Ladekontrolle wurde ein Anti-Aktin-Antikörper verwendet, der Aktin bei 42 kDa in allen Proben, mit gleicher Intensität, detektierte. Als Marker (M) wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet.

5. Diskussion

Für die korrekte Entwicklung eines Embryos sind Homöobox-Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Diese sogenannten *Hox*-Gene bestimmen durch ihre überlappenden Expressionsdomänen die Identität der einzelnen Körpersegmente (Krumlauf, 1994; McGinnis und Krumlauf, 1992). Die Elemente der Extremitäten werden vor allem durch die Gene des *Hoxa*- und *Hoxd*-Clusters definiert, wie verschiedene Deletionsmutanten bewiesen haben (Kmita et al., 2005; Tarchini et al., 2006). Während die Funktion von *Hox*-Genen in der Bestimmung regionaler Identität der Gliedmaßelemente bereits ausführlich beschrieben wurde (Davis et al., 1995; Fromental-Ramain et al., 1996a; Fromental-Ramain et al., 1996b), lieferte die Analyse von Vordergliedmaßen der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mausmutanten erste Hinweise auf eine weitere Funktion von *Hox*-Genen während der Chondrozytendifferenzierung (Boulet und Capecchi, 2004). Dieser Defekt in der Differenzierung der Chondrozyten sollte in dieser Arbeit sowohl morphologisch als auch molekular im Detail analysiert und mit der Differenzierung in *Ulnaless*-Gliedmaßen verglichen werden. Des Weiteren wurde die Regulation von *Ihh* untersucht, welches in *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten stark verzögert exprimiert ist (Boulet und Capecchi, 2004) und ein Schlüsselmolekül der Chondrozytendifferenzierung darstellt.

5.1 Funktion von *Hoxa11* und *Hoxd11* während der Gliedmaßenentwicklung

Die in dieser Arbeit untersuchten *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten besitzen im Vergleich zum Wildtyp erheblich verkürzte Vordergliedmaßen, die aus einer spezifischen Reduktion von Ulna und Radius resultieren. Die weiteren Knorpelanlagen in den Vordergliedmaßen der Mutanten sind jedoch nicht verändert. Obwohl die Vorderextremitäten beider Mutanten einen starken Phänotyp zeigen, weisen die Hintergliedmaßen einen wesentlich schwächeren Phänotyp auf (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995; Davisson und Cattanaach, 1990; Herault et al., 1997; Peichel et al., 1996; Peichel et al., 1997). In dieser Arbeit wurden Hinweise gefunden, dass der abgeschwächte Phänotyp der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Hintergliedmaßen durch Kompensation des paralogen *Hoxc11* hervorgerufen wird.

Da in *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Vorderextremitäten spezifisch der Zeugopod verändert ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie die positionelle Information von *Hox*-Genen in ein spezifisches Knochenmuster umgesetzt wird. Hierzu sollte eine morphologische und molekulare Analyse der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten durchgeführt werden, um Aufschluss über die Mechanismen zu erhalten, wie *Hox*-Gene das Differenzierungsprogramm der Chondrozyten in einzelnen Skelettelementen steuern.

5.1.1 Regulation der Chondrozytendifferenzierung in Ulna und Radius durch *Hoxa11* und *Hoxd11*

Zur Identifikation der Funktion von *Hox*-Genen während der Differenzierung von Chondrozyten wurden die Vorderextremitäten von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten sowohl morphologisch als auch molekular untersucht.

Der morphologische Vergleich zeigte, dass nur die Ulna von *Ulnaless*-Mäusen einen ähnlichen Defekt in der Chondrozytendifferenzierung aufweist wie Ulna und Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten. Der Radius von *Ulnaless*-Mutanten zeigt dagegen sowohl morphologisch als auch molekular alle Stadien einer normalen Chondrozytendifferenzierung. Aufgrund dessen wird zunächst der Differenzierungsdefekt der Chondrozyten in Ulna und Radius der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten und in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten diskutiert. Diese Knorpelanlagen der beiden Mutanten werden im weiteren Verlauf als Zeugopod zusammengefasst.

Im Stadium E14.5 konnten im Zeugopod von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten morphologisch nur schwach-proliferierende, runde Chondrozyten nachgewiesen werden, die als distale Chondrozyten bezeichnet werden. Dieser Arrest der Chondrozytendifferenzierung im Stadium E14.5 wurde auch auf molekularer Ebene bestätigt. Obwohl die Kondensationen im Zeugopod reduziert sind (Boulet und Capecchi, 2004), wurden *Col2a1* und *Sox9*, als Marker der frühen Chondrozytendifferenzierung, in allen Chondrozyten exprimiert, während die Expression der prähypertrophen Chondrozytenmarker *Ihh* und *Runx2* im Zeugopod beider Mutanten fehlte. Der Verlust von *Hoxa11* und *Hoxd11* scheint demzufolge nicht die initiale Differenzierung zu Chondrozyten zu beeinflussen, sondern die hypertrophe Differenzierung zu blockieren. Dieser Arrest der hypertrophen

Differenzierung hielt im Stadium E16.5 an und wurde erst am Tag E18.5 überwunden, da dann erste hypertrophe Chondrozyten nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise fand nach dem Beginn der hypertrophen Differenzierung eine rasche Ossifikation der Skelettelemente statt.

Um den Schritt der Chondrozytendifferenzierung näher zu charakterisieren, der im Zeugopod der Mutanten inhibiert ist, wurde die Expression von Genen untersucht, die in spezifischen Subpopulationen der proliferierenden Chondrozyten exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass *Fgfr3* im Stadium E14.5 schwach im Zeugopod beider Mutanten exprimiert wird. In Übereinstimmung mit der morphologischen Analyse deutet dies darauf hin, dass keine kolumnaren Chondrozyten vorhanden sind. Durch die schwache Expression von *Fgfr3* wurde allerdings vermutet, dass alle Chondrozyten im Zeugopod der Mutanten distalen Zellcharakter besitzen. Diese Hypothese konnte durch die Analyse der distalen Chondrozytenmarker *Fgfr1* und *Ucma* widerlegt werden. Beide Gene waren im Stadium E16.5 nicht, wie vermutet, in allen Chondrozyten der Knorpelanlage exprimiert. Aus dieser Untersuchung lässt sich schließen, dass die Chondrozytendifferenzierung zu einem frühen Zeitpunkt gestört ist und die vor dem Stadium E14.5 auftretende Unterteilung sowohl in distale als auch kolumnare Chondrozyten ausbleibt. Dagegen ist im Stadium E18.5, entsprechend dem Auftreten von hypertrophen Chondrozyten, wieder das wildtypische Expressionsmuster von *Ucma* und *Ihh* zu finden.

Zusammenfassend lässt sich die Schlußfolgerung ziehen, dass im Stadium E14.5 und E16.5 die Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Mutanten blockiert ist. Jedoch wird im Stadium E18.5 dieser Arrest wieder aufgehoben, so dass die Chondrozyten schließlich das normale Differenzierungsprogramm durchlaufen können. Demzufolge sind *Hoxa11* und *Hoxd11* für die korrekte, zeitliche Abfolge der Chondrozytendifferenzierung notwendig.

Auffällig bei der Untersuchung der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Mutanten ist die Tatsache, dass die Chondrozyten im Stadium E14.5 trotz fehlender *Ihh*-Expression nicht zu hypertrophen Zellen differenzieren, obwohl *Ihh*-defiziente Mäuse eine beschleunigte, hypertrophe Differenzierung aufweisen (St-Jacques et al., 1999). Damit ausgeschlossen werden kann, dass das Expressionslevel von *Ihh* unter dem Detektionslimit der *in situ* Hybridisierung lag, wurde zunächst die Expression von *Ptch1* untersucht.

Ptch1 ist im Wildtyp in allen Chondrozyten verstärkt exprimiert, die ein *Ihh*-Signal erhalten (St-Jacques et al., 1999). Es konnte jedoch keine signifikante Expression von *Ptch1* im Zeugopod beider Mutanten nachgewiesen werden. Außerdem wurden Gliedmaßen-Kulturen von E13.5 *Ulnaless*-Embryonen mit Cyclopamin behandelt, welches den *Ihh*-Signalweg inhibiert (Chen et al., 2002). Demzufolge sollte nicht detektierbares *Ihh* inaktiviert und die hypertrophe Differenzierung beschleunigt werden. Da durch Cyclopamin-Behandlung jedoch keine Veränderung der Chondrozytendifferenzierung in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten hervorgerufen wurde, kann eine *Ihh*-Expression unter dem Detektionslimit weitgehend ausgeschlossen werden. Folglich ist der Defekt in der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von E14.5 *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Mutanten nicht durch den alleinigen Verlust der *Ihh*-Expression zu erklären.

5.1.2 *Shox2* ist ein putatives Zielgen von *Hoxa11* und *Hoxd11*

Die Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Mutanten weist viele Ähnlichkeiten zu Phänotypen anderer Mausmutanten auf. *Runx2*^{-/-} und besonders *Runx2*^{-/-};*Runx3*^{-/-}-Mutanten sowie Mäuse mit der Gliedmaßen-spezifischen *Shox2*-Deletion weisen in frühen Embryonalstadien ebenfalls verkürzte Gliedmaßen, eine inhibierte Chondrozytendifferenzierung sowie eine fehlende *Ihh*-Expression auf (Cobb et al., 2006; Kim et al., 1999; Yoshida et al., 2004). Während der Defekt der Chondrozytendifferenzierung in *Runx2*^{-/-};*Runx3*^{-/-}-Mäusen nicht auf Ulna und Radius beschränkt ist (Yoshida et al., 2004), ist in *Shox2*^{c/-}-Mutanten der Arrest der Chondrozytendifferenzierung spezifisch im Humerus beschrieben (Cobb et al., 2006). Aufgrund der Ähnlichkeit der Phänotypen wurde die Expression von *Runx2* und *Shox2* im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-};*d11*^{-/-} und *Ulnaless*-Mutanten analysiert. Beide Gene wurden nicht in den Chondrozyten des Zeugopods exprimiert, jedoch in allen anderen Knorpelanlagen. Demzufolge scheinen die Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Shox2* *downstream* von *Hoxa11* und *Hoxd11* die Chondrozytendifferenzierung spezifisch im Zeugopod zu regulieren. Entsprechend hierzu konnte keine Änderung der Expression von *Hoxa11* und *Hoxd11* in *Shox2*^{c/-}-Embryonen nachgewiesen werden (Cobb et al., 2006). In der gleichen Arbeit wurde außerdem festgestellt, dass *Runx2* im Humerus von *Shox2*^{c/-}-Mutanten nicht exprimiert ist (Cobb et al., 2006).

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich folgende Signalkaskade zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung (Abb. 5.1): *Hoxa11* und *Hoxd11* induzieren direkt oder indirekt die Expression von *Shox2*. Durch *Shox2* wird wiederum *Runx2* aktiviert, das in einem weiteren Schritt die Expression von *Ihh* induziert. *Ihh* wirkt schließlich positiv auf die Proliferation der Chondrozyten und reguliert den Beginn der hypertrophen Differenzierung über den *Ihh*/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus (Abb. 1.3) (St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996).

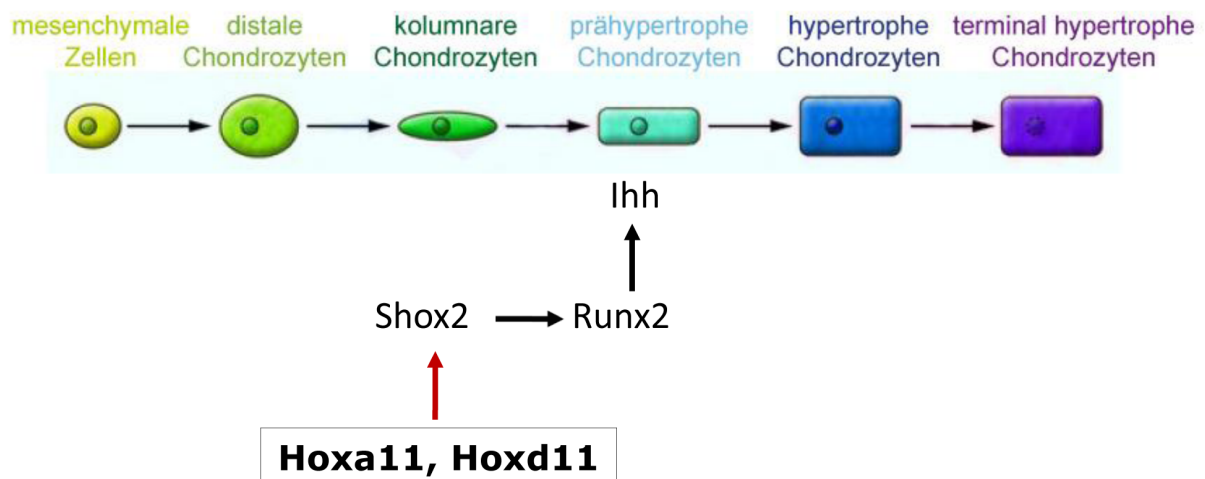


Abb. 5.1: Modell der ermittelten Signalkaskade zur Regulation der Differenzierung von Chondrozyten. *Hoxa11* und *Hoxd11* aktivieren die Expression von *Shox2*. Ob diese Aktivierung direkt oder über weitere Faktoren verläuft, muss in weiteren Analysen überprüft werden (roter Pfeil). Weiterhin induziert *Shox2* die Expression von *Ihh* über die Aktivierung von *Runx2*. Schließlich wird durch *Ihh* die Proliferation der Chondrozyten sowie die hypertrophe Differenzierung reguliert.

Zur Überprüfung, ob *Shox2* ein direktes Zielgen von *Hoxa11* und *Hoxd11* ist, können zum einen Promotor-Analysen von *Shox2* durchgeführt werden und zum anderen *Shox2*-transgene Mäuse mit *Ulnaless*-Mäusen gekreuzt werden. Falls *Shox2* an der Umsetzung der *Hoxa11*- und *Hoxd11*-Funktion beteiligt ist, sollten diese Überexpressionsstudien zumindest teilweise zu einer Wiederherstellung des korrekten, zeitlichen Ablaufs der Chondrozytendifferenzierung in der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten führen.

5.1.3 *Hoxa11* und *Hoxd11* regulieren die räumliche Orientierung der Chondrozyten im Zeugopod

Im Vergleich zur Ulna ist im Radius der *Ulnaless*-Mutanten sowohl morphologisch als auch molekular keine Änderung in der Chondrozytendifferenzierung zu erkennen. Durch die Inversion des *Hoxd*-Clusters sind in *Ulnaless*-Mutanten *Hoxd12* und

Hoxd13 ektopisch im Zeugopod exprimiert (Herault et al., 1997; Peichel et al., 1997). Diese Missexpression ist jedoch posterior stärker ausgeprägt und resultiert dort im Vergleich zum Wildtyp in einer verringerten Expression von *Hoxd11* sowie dem Verlust von *Hoxa11*. In der anterioren Region des Zeugopods wurde dagegen ausschließlich eine leichte Reduktion des *Hoxa11*-Transkripts ermittelt (Peichel et al., 1997). Aufgrund dessen ist der anterior-liegende Radius weniger stark von der Missexpression betroffen und die Chondrozyten können das normale Differenzierungsprogramm durchlaufen. Die Krümmung des Radius ist vermutlich ein sekundärer Effekt, der durch die wesentlich kleinere Ulna zu erklären ist.

Im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten wurde dagegen eine veränderte Chondrozytendifferenzierung nachgewiesen. Auffällig bei der morphologischen Analyse des Radius im Stadium E16.5 war die Anwesenheit kolumnarer Chondrozyten, die anstatt in proximal-distaler Richtung entlang der anterior-posterioren Achse orientiert waren. Demnach scheinen diese Zellen ihre proximal-distale Polarität verloren zu haben. Die im Stadium E18.5 auftretenden hypertrophen Chondrozyten zeigten ebenfalls eine veränderte Orientierung im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten. Da im Wildtyp *Hoxa11* in den distalen Regionen von Ulna und Radius exprimiert ist (Nelson et al., 2008), *Hoxd11* jedoch hauptsächlich in der distalen Region der Ulna (Boulet und Capecchi, 2004), ist anzunehmen, dass der Orientierungsverlust der Chondrozyten im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten durch den alleinigen Verlust von *Hoxa11* ausgelöst wird. Ein Zielgen von *Hoxa11* ist *Integrin $\alpha 8$* , das als solches in der Niere von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten identifiziert wurde (Valerius et al., 2002). Da Integrine sowohl für die Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix als auch für die Zellmigration wichtig sind (Hynes, 2002), ist eine Veränderung des Integrin-Signalwegs im Radius von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten nicht ausgeschlossen. Des Weiteren könnte *Hoxa11* auch Einfluss auf den Fgf-Signalweg besitzen. Hinweise darauf ergab die Expressionsanalyse des distalen Chondrozytenmarkers *Fgfr1*, der im Radius von E16.5 *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*-Mutanten anstatt proximal und distal in der anterioren und posterioren Region exprimiert ist. Bereits in der frühen Gliedmaßenknospe wurde eine verringerte *Fgf8*- und *Fgf10*-Expression ermittelt, die auf eine Störung des Fgf-Signalwegs hindeutet (Boulet und Capecchi, 2004). Zusammenfassend ist festzustellen, dass *Hoxa11* und *Hoxd11* für die räumliche Orientierung der Chondrozyten in der Knorpelanlage notwendig sind.

5.1.4 Zellautonome Regulation der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod durch *Hoxa11* und *Hoxd11*

Obwohl die molekulare Analyse der Chondrozytendifferenzierung im Zeugopod von *Hoxa11*^{-/-}; *d11*^{-/-}- und *Ulnaless*-Mutanten auf eine Regulation der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Shox2* durch *Hoxa11* und *Hoxd11* in Chondrozyten hinweist, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt direkt erfolgt oder ob äußere Faktoren an der Regulation der Chondrozytendifferenzierung beteiligt sind. Die Schwierigkeit bei der Interpretation dieser Ergebnisse besteht in der Tatsache, dass die Expression von *Hox*-Genen im Knorpel, im Gegensatz zur Expression in der frühen Gliedmaßenknospe, kontrovers diskutiert wird.

Im Zeugopod von Hühner-Vordergliedmaßen des Stadiums 28 (vergleichbar mit Stadium E12.5 der Maus) wurden *Hoxa11* und *Hoxd11* im Mesenchym, angrenzend an das Perichondrium der Knorpelanlage, nachgewiesen und nicht in den Kondensationen oder im Perichondrium (Suzuki und Kuroiwa, 2002). Im Gegensatz dazu wurde durch die Expressionsanalyse von *Hoxa11* in Maus-Vorderextremitäten gezeigt, dass *Hoxa11* im Stadium E12.5 in den Zeugopod-Kondensationen, im Stadium E13.5 in den distalen Enden von Ulna und Radius und im Stadium E15.5 im Perichondrium der distalen Bereiche von Ulna und Radius exprimiert ist (Nelson et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob *Hoxa11* und *Hoxd11* die Chondrozytendifferenzierung zellautonom regulieren oder ob Faktoren aus der Umgebung die Differenzierung der Chondrozyten inhibieren, wurden Gliedmaßen- und Micromass-Kulturen untersucht. In Gliedmaßen-Kulturen differenzierten die *Ulnaless*-Vorderextremitäten weiterhin mit einer verkürzten Ulna, obwohl Haut und Muskeln von den Gliedmaßen entfernt wurden und eine Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren erfolgte. Demzufolge scheint der Einfluss von *Hox*-Genen auf die Chondrozytendifferenzierung zellautonom zu sein. Diese Annahme wird durch die Expressionsanalyse des Retinsäure-produzierenden Enzyms *Raldh2* in *Ulnaless*-Gliedmaßen unterstützt. Retinsäure, die als parakriner Faktor die Chondrogenese inhibiert (Desbiens et al., 1990; Kuss et al., 2009; Wedden et al., 1987), wirkt im Zeugopod von *Ulnaless*-Mäusen nicht auf das Wachstum der Knorpelanlagen, da *Raldh2* dort nicht ektopisch exprimiert ist. Die zellautonome Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch *Hoxa11* und *Hoxd11* wird durch

Micromass-Kulturen von primären Chondrozyten aus E12.5 *Ulnaless*-Vorderextremitäten bestätigt, in denen im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger Kondensationen nachgewiesen wurden. Da die primären Chondrozyten in der Micromass-Kultur nicht in dem gleichen Zellverband vorliegen wie in der Knorpelanlage der Gliedmaße, kann dieser beobachtete Defekt der Chondrozytendifferenzierung nicht durch umgebende Faktoren ausgelöst worden sein. Demnach ist der ermittelte Differenzierungsdefekt in der Ulna von *Ulnaless*-Gliedmaßen zellautonom. Folglich müssen die Chondrozyten im Zeugopod der *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten durch ein genetisches Programm festgelegt sein, welches die Differenzierung der Chondrozyten inhibiert. Da nicht nur der Verlust der posterioren *Hoxa11*- und *Hoxd11*-Gene die Chondrozytendifferenzierung inhibiert, sondern auch die Überexpression der anterioren *Hox*-Gene *Hoxa2*, *Hoxd4* und *Hoxc8* im Axialskelett (Massip et al., 2007; Yueh et al., 1998), ist eine allgemeingültige Regulation der Differenzierung von Chondrozyten durch *Hox*-Gene anzunehmen. Wie dieses Programm aufrecht erhalten wird und welche epigenetischen Prozesse daran beteiligt sind, ist eine wichtige Frage für zukünftige Studien.

5.1.5 Verlust der distalen Ulna in *Ulnaless*-Mutanten

Die morphologische Analyse der Ulna in E18.5 *Ulnaless*-Mutanten zeigte, dass die Chondrozyten der Ulna in der Mitte der Knorpelanlage hypertroph wurden und die Ulna ausgehend von der Mitte mineralisierte. Diese Art der hypertrophen Differenzierung und Mineralisierung ist sonst nur in den Knochen des Carpus zu finden. Das wirft die Frage auf, ob die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten durch eine homöotische Transformation in einen Handwurzelknochen umgewandelt wurde.

Hinweise auf eine homöotische Transformation in Gliedmaßen lieferten Überexpressionsstudien von *Hoxa13* in den Hinterextremitäten von Hühnern. Diese zeigten wie in *Ulnaless*-Mutanten eine spezifische Reduktion des Zeugopods sowie eine ähnliche Änderung in der Chondrozytendifferenzierung. Außerdem wiesen die *Hoxa13*-überexprimierenden Skelettelemente, Fibula und Tibia, nicht die charakteristischen Chondrozytenstadien eines Röhrenknochens auf, sondern die histologische Struktur einer Knorpelanlage im Tarsus. Diese Beobachtung lässt auf eine *Hoxa13*-induzierte homöotische Transformation von Fibula und Tibia zu einem Knochen des Tarsus schließen (Yokouchi et al., 1995). Da in

Ulnaless-Vordergliedmaßen das paraloge *Hoxd13* im Zeugopod ektopisch exprimiert ist, wird vermutet, dass *Hoxd13* eine ähnliche Funktion im Zeugopod von *Ulnaless*-Mutanten ausübt und somit eine homöotische Transformation auslöst.

Zur Bestätigung dieser Theorie wurde die Expression von Markern der Handwurzelknochen untersucht. Erste Hinweise auf eine vollständige homöotische Transformation der Ulna von *Ulnaless*-Mutanten zu einem Knochen des Carpus konnten dadurch jedoch nicht bestätigt werden. *Gdf5* wurde nicht, wie erwartet, im Mesenchym um die Ulna herum exprimiert, sondern wie im Wildtyp um die Carpus-Knochen. Des Weiteren wurde die Expression von *Col2a1* (*Typ-IIA*) in der äußersten Zellschicht der Ulna erwartet, da diese im Wildtyp die Grenzen der Handwurzelknochen markiert. *Col2a1* (*Typ-IIA*) wurde jedoch nur in der anterioren Region der Ulna, die ein Gelenk mit dem Humerus bildet, in der äußersten Zellschicht detektiert.

Im postnatalen Stadium P6 zeigte die Ulna von *Ulnaless*-Mutanten auch morphologisch keine Merkmale mehr eines Handwurzelknochens, da die Ulna in diesem Stadium wie ein Röhrenknochen mineralisierte und eine Wachstumsfuge ausgebildet hat. Interessanterweise ähnelte die gesamte Ulna jedoch nun vielmehr dem Olecranon, der im Wildtyp die proximale Region der Ulna darstellt und das Ellenbogengelenk bildet. Die Expressionsanalyse von *Ucma* in E16.5 und E18.5 *Ulnaless*-Gliedermaßen unterstützt die Annahme, dass die Ulna nur aus dem Olecranon besteht, da *Ucma* wie im Olecranon des Wildtyps exprimiert ist. Bei genauerer Betrachtung der Morphologie der Ulna von postnatalen *Ulnaless*-Embryonen wurde festgestellt, dass die Chondrozytendifferenzierung im distalen Bereich der Ulna stärker beeinflusst ist als im proximalen. In der distalen Region der Ulna sind keine parallel angeordneten Trabekel zu erkennen wie im proximalen Bereich. Diese Daten lassen vermuten, dass sich in *Ulnaless*-Vorderextremitäten nicht eine verkürzte Ulna gebildet hat, sondern ausschließlich das Olecranon. Da das Olecranon am proximalen Ende der Ulna liegt und dessen Bildung in *Ulnaless*-Vorderextremitäten weniger gestört ist, scheint sich die ektopische Expression von *Hoxd12* und *Hoxd13* in *Ulnaless*-Vorderextremitäten auf den distalen Bereich der Ulna zu beschränken, um dort die Funktion von *Hoxa11* und *Hoxd11* zu reprimieren.

5.2 Identifikation von Gliedmaßen-spezifischen Enhancern und regulatorischen Proteinen von *Ihh*

Der Wachstumsfaktor *Ihh* besitzt verschiedene Funktionen während der enchondralen Ossifikation. Durch die Analyse von *Ihh*^{-/-}-Mäusen wurde festgestellt, dass *Ihh* für eine normale Chondrozytendifferenzierung essentiell ist, da in diesen Mäusen die Proliferation der Chondrozyten reduziert und die hypertrophe Differenzierung gestört ist (St-Jacques et al., 1999). Zur Gewinnung von neuen Erkenntnissen über die Regulation der Chondrozytendifferenzierung ist daher die Identifikation von Faktoren erforderlich, die die Expression von *Ihh* regulieren. In dieser Arbeit sollten Enhancer und Transkriptionsfaktoren zur Regulation von *Ihh* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert werden.

5.2.1 Regulation der Expression von *Ihh* durch Homöobox-Transkriptionsfaktoren

Zur Untersuchung von *Ihh*-Enhancern *in vitro* wurden die konservierten Sequenzen des 5'-Bereichs von *Ihh* in einen Vektor kloniert, der einen Minimalpromotor und ein Luciferase-Reportergen beinhaltet. Durch die Transfektion dieser Konstrukte in mesenchymale Zellen konnte nur das 1,9 kb große T1-Fragment als Enhancer von *Ihh* identifiziert werden. Des Weiteren wurden die Homöobox-Proteine SHOX und SHOX2 als Regulatoren von *Ihh* ermittelt, da beide Proteine das T1-Fragment aktivierten.

Für SHOX wurde bereits eine Funktion als transkriptioneller Aktivator in der osteogenen Zelllinie U2Os beschrieben (Akita et al., 2008; Rao et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von SHOX in primären Chondrozyten zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose führt (Marchini et al., 2004). Im humanen Embryo ist SHOX in allen Chondrozyten von Ulna und Radius exprimiert, jedoch mit einem stärkeren Expressionslevel in hypertrophen Chondrozyten. Die SHOX2-Expression überlappt zum Teil mit der Expression von SHOX, ist allerdings eher in proximalen Regionen der Gliedmaßen zu finden (Marchini et al., 2004). Da SHOX *in vitro* den T1-Enhancer von *Ihh* aktiviert und SHOX und *Ihh* in hypertrophen Chondrozyten koexprimiert werden, ist eine Regulation der *Ihh*-Expression durch SHOX auch *in vivo* denkbar. SHOX würde demnach als Regulator von *Ihh* fungieren, der die

hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten mit dem Arrest des Zellzyklus koordiniert.

Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren HOXA9, Hoxa11 und Hoxd11 wurden im Gegensatz zur *in vivo* Analyse von *Hoxa11^{-/-};d11^{-/-}* und *Ulnaless*-Vorderextremitäten, *in vitro* als Repressoren von *Ihh* identifiziert, da diese Faktoren das T1-Fragment negativ regulierten. Da für die *in vitro* Analyse alle Zellen der Wildtyp-Gliedmaßenknospe transfiziert wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Aktivierung von *Ihh* in Chondrozyten durch eine stärkere Repression in anderen Zelltypen unterdrückt wurde. Aufgrund dessen ist die Transfektion einer reinen Chondrozyten-Kultur notwendig, um die Repression von *Ihh* durch *Hox*-Gene zu überprüfen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Regulation des T1-Fragments durch die verschiedenen Homöobox-Transkriptionsfaktoren spezifisch erfolgte und nicht aufgrund der ähnlichen DNA-bindenden Homöobox zustande gekommen ist.

Eine weitere Repression des T1-Fragments wurde durch BMP2 beobachtet. Dieser Effekt steht jedoch im Gegensatz zur Literatur, in der die Aktivierung eines bereits identifizierten *Ihh*-Enhancers durch BMP2 beschrieben wurde (Retting et al., 2009; Seki und Hata, 2004). Der einzige Unterschied dieses *Ihh*-Enhancers zum T1-Enhancer besteht in der Größe, da das T1-Fragment 600 bp größer ist als der bereits beschriebene 1,3 kb *Ihh*-Enhancer. Jedoch liegen in beiden Enhancern Bindungsstellen für Smad-Proteine, die die Aktivierung von *Ihh* durch BMP2 vermitteln (Seki und Hata, 2004). Ein Grund für die unterschiedlichen Effekte von BMP2 auf die beiden Enhancer könnten die verwendeten Zellen sein. Die Aktivierung des 1,3kb *Ihh*-Enhancers durch BMPs wurde in P19-Karzinomzellen und in Chondrosarkomzellen der Ratte beobachtet (Retting et al., 2009; Seki und Hata, 2004), während die BMP2-induzierte Repression des T1-Fragments in mesenchymalen Zellen der Gliedmaßenknospe von Wildtyp-Mäusen festgestellt wurde.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in früheren Studien bereits als Aktivator des 1,3 kb *Ihh*-Enhancers nachgewiesen wurde, ist Runx2 (Yoshida et al., 2004). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Aktivierung des T1-Enhancers durch Runx2 beobachtet.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit SHOX, SHOX2 und Runx2 *in vitro* als Aktivatoren von *Ihh* identifiziert, während *Hox*-Gene sowie BMP2 vermutlich als Repressoren dienen.

5.2.2 Der proximale *Ihh*-Promotorbereich ist nicht ausreichend zur Aktivierung der Expression von *Ihh* in Chondrozyten

Zur Identifikation von *Ihh*-Enhancern *in vivo* wurden die ermittelten, konservierten Sequenzen aus dem 5'Bereich von *Ihh* in einen *lacZ*-Reporter-Vektor kloniert und mit diesen Konstrukten transgene Mausembryonen generiert. *In vivo* wurde für keines der Promotor-Konstrukte eine Enhancer-Aktivität zur Regulation der *Ihh*-Expression in den Gliedmaßen festgestellt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Konstrukte im Genom der transgenen Mäuse an Stellen integriert sind, die eine Transkription des *lacZ*-Reportergens verhindern. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Größe der Fragmente nicht ausreichte, um die *Ihh*-Expression in den Extremitäten zu steuern. Zur Identifikation von Gliedmaßen-spezifischen *Ihh*-Enhancern sind daher größere Fragmente oder die Kombination mehrerer regulatorischer Elemente notwendig. Außerdem ist die Analyse eines größeren Sequenz-Bereichs zur Identifikation von *Ihh*-Enhancern sinnvoll. In der Mutante *Doublefoot* (*Dbf*) wurde bereits ein 2,5 Mb entfernter *Ihh*-Enhancer vermutet, der eine ektopische Expression von *Ihh* in der Mutante auslöst (Crick et al., 2003; Yang et al., 1998). Diese ektopische Expression führt in der *Dbf*-Mutante schließlich zu einer prä-axialen Polydaktylie (Hayes et al., 1998), die in anderen Mutanten durch ektopisches *Shh* induziert wird (Masuya et al., 1995; Qu et al., 1997; Sharpe et al., 1999). Für das homologe *Shh* wurden ebenfalls Enhancer bis zu 1 Mb entfernt von *Shh* nachgewiesen (Lettice et al., 2003; Lettice et al., 2002; Sagai et al., 2009). Zur Identifikation von weit entfernt liegenden Enhancern ist die Generierung von transgenen Mäusen mittels bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BACs) hilfreich. Der Vorteil von BACs ist, dass bis zu 300 kb große Genomabschnitte inseriert werden können (Lottspeich und Zorbas, 1998), wodurch direkt eine sehr große Region auf die Anwesenheit von Enhancern untersucht werden kann.

5.2.3 MMP3 ist ein putativer Regulator der *Ihh*-Expression

Mit Hilfe des Hefe-Ein-Hybrid Systems sollten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die durch Bindung an das hoch konservierte Y1H-Fragment die Expression von *Ihh* aktivieren können. Es wurden 62 positive Hefe-Klone detektiert. In den Klonen Nr. 23 und Nr. 45 wurde die kodierende Sequenz für das extrazelluläre Matrixprotein MMP3 nachgewiesen, das bereits als transkriptioneller Aktivator beschrieben wurde (Eguchi et al., 2008). Die anderen Klone enthielten keine kodierenden Sequenzen für potentielle Regulatoren der Transkription und wurden daher als falsch positive Klone bewertet. Die hohe Anzahl an falsch positiven Hefe-Klonen ist bedingt durch das hohe, basale *HIS3*-Expressionsniveau des Y1H-pHIS2-Vektors. Obwohl fast die dreifache Menge der empfohlenen Konzentration des 3-AT-Inhibitors eingesetzt wurde, konnte die basale *HIS3*-Expression offensichtlich nicht ausreichend unterdrückt werden.

Obwohl beide MMP3-Klone eine Verschiebung des Leserahmens aufwiesen, wurde mit Hilfe eines Western Blots überprüft, ob das GAL4-MMP3-Fusionsprotein in der Hefe synthetisiert wird, da translationale Leserahmenverschiebungen in der Hefe häufig auftreten (Matsufuji et al., 1996). Zumindest für Klon Nr. 45 konnte MMP3 im Protein-Extrakt nachgewiesen werden. Der Western Blot zeigte zwei Banden, die aufgrund der Größe zwei Formen des aktiven MMP3-Proteins zugeordnet werden können (Si-Tayeb et al., 2006).

MMP3 gehört zu der Familie der Matrix-Metallopeptidasen. Diese Zink-abhängigen Endopeptidasen können extrazelluläre Matrix-Proteine spalten und regulieren dadurch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Massova et al., 1998). MMP3 wird als inaktives Proenzym sekretiert und extrazellulär durch Proteasen, vor allem Plasmin, aktiviert (Okada et al., 1988). Intrazellulär kann MMP3 jedoch auch durch die Protease Furin aktiviert werden (Cao et al., 2005). In früheren Studien wurde gezeigt, dass aktives MMP3 im Nukleus von Leberzellen zu finden ist und den Beginn der Apoptose initiiert (Si-Tayeb et al., 2006). Weitere Untersuchungen in der Zellkultur zeigten, dass die Überexpression von MMP3 den Promotor des *Connective tissue growth factors* (*CTGF/CCN2*) aktivieren kann. Diese Aktivierung von *CTGF* wurde in Zellkultur-Experimenten sowohl mit dem Pro-Protein von MMP3 als auch mit dem aktiven MMP3 nachgewiesen. Des Weiteren wurde in dieser Studie MMP3 im Nukleus von Chondrozyten detektiert (Eguchi et al., 2008).

Interessanterweise wird MMP3 genauso wie *CTGF* und *Ihh* in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Hasky-Negev et al., 2008; Vortkamp et al., 1996; Yamaai et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MMP3 ein guter Kandidat für einen Regulator der *Ihh*-Expression ist.

Zur Bestätigung der Bindung von MMP3 an den *Ihh*-Promotor müssen jedoch weitere Untersuchungen, wie ein elektrophoretischer Mobilitätstest, Luciferase-Assays oder Chromatin-Immunopräzipitationen, durchgeführt werden.

5.3 Modell zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde folgendes, vorläufiges Modell zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung erstellt, welches in weiteren Untersuchungen zu bestätigen ist. *Hoxa11* und *Hoxd11* wurden als neue Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung identifiziert, die den exakten zeitlichen und räumlichen Verlauf der Chondrozytendifferenzierung regulieren. Diese *Hox*-Gene aktivieren den Homöobox-Transkriptionsfaktor Shox2, der wiederum einen weiteren Transkriptionsfaktor, Runx2, aktiviert. Runx2 induziert schließlich die Expression von *Ihh* durch direkte Aktivierung des *Ihh*-Promotors. Als weitere Regulatoren der *Ihh*-Expression wurden Shox2 und Mmp3 nachgewiesen, die den *Ihh*-Promotor aktivieren. Im Gegensatz zur *in vivo* Analyse wurden außerdem *Hoxa11* und *Hoxd11* *in vitro* als Repressoren von *Ihh* identifiziert.

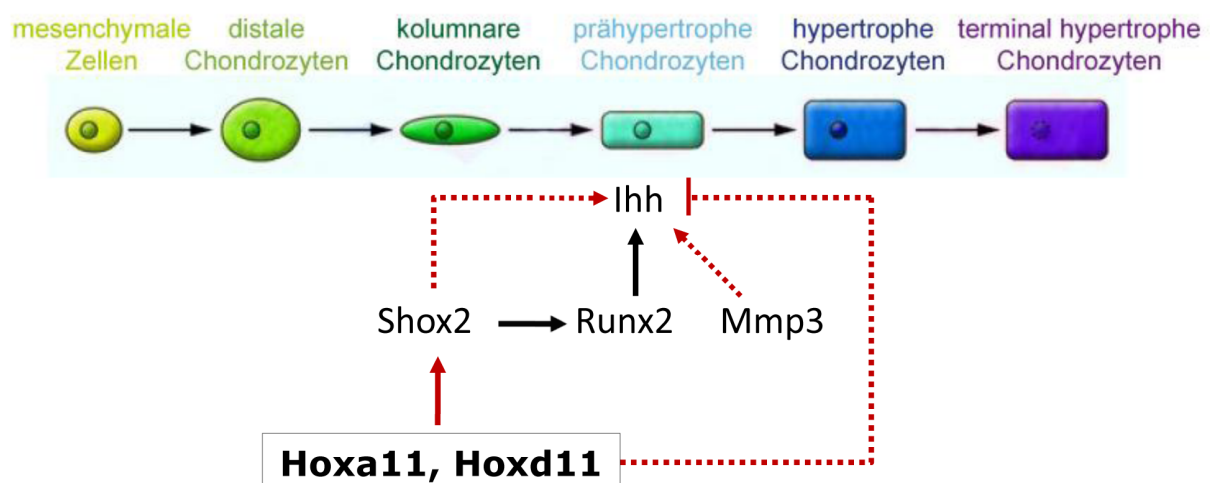


Abb. 5.2: Modell zur Regulation der Chondrozytendifferenzierung. Die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten wird durch die Shox2-induzierte *Ihh*-Expression initiiert. Weiterhin kann die Expression von *Ihh* durch Mmp3 aktiviert und durch *Hoxa11* und *Hoxd11* reprimiert werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind rot markiert. Gestrichelte Pfeile stellen die Ergebnisse aus Zellkultur-Experimenten dar, während durchgehende Pfeile die *in vivo* Resultate zeigen.

6. Zusammenfassung

Hox-Gene spielen bei der Gliedmaßenentwicklung eine entscheidende Rolle, da sie durch ihre überlappenden Expressionsdomänen die Identität der einzelnen Knochen definieren. Für die Bildung von Ulna und Radius sind *Hoxa11* und *Hoxd11* essentiell, wie die erhebliche Reduktion dieser Knochen in *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Mausmutanten beweist (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995). Neben dem Einfluss von *Hox*-Genen auf die Identität der Gliedmaßelemente wurden in *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Embryonen Hinweise auf eine Funktion der *Hox*-Gene während der Chondrozytendifferenzierung gefunden (Boulet und Capecchi, 2004). Der Einfluss von *Hoxa11* und *Hoxd11* auf die Chondrozytendifferenzierung sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Vorderextremitäten von *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Mausmutanten im Detail analysiert werden. Da nach Mendel die Wahrscheinlichkeit in einem Wurf einen *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Embryo zu bekommen nur 6,25% beträgt, wurden zusätzlich die Vorderextremitäten von Mäusen mit der dominanten *Ulnaless*-Mutation untersucht, die in einem Wurf 50% *Ulnaless*-Embryonen erzeugen. Die *Ulnaless*-Mäuse dienen als Modell der *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Mutation, da im Zeugopod dieser Mäuse die Funktion von *Hoxa11* und *Hoxd11* durch ektopische Expression posteriorer *Hox*-Gene reprimiert ist und sie deshalb einen ähnlichen Phänotyp der Vordergliedmaßen wie *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Mutanten besitzen.

Der Vergleich der Chondrozytendifferenzierung in den Vordergliedmaßen von *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten ergab, dass nur die Ulna der *Ulnaless*-Embryonen durch die ektopische Expression von *Hoxd12* und *Hoxd13* beeinflusst ist und somit als Modell der *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*-Mutation dienen kann. Beide Mauslinien weisen im Zeugopod am Tag E14.5 und E16.5 sowohl auf morphologischer als auch molekularer Ebene eine Inhibition der Chondrozytendifferenzierung auf. Es wurden hauptsächlich Chondrozyten eines frühen Differenzierungsstadiums in Ulna und Radius der Mutanten detektiert. In späteren Embryonalstadien wurden jedoch auch kolumnare und hypertrophe Chondrozyten im Zeugopod der Mutanten nachgewiesen, so dass man insgesamt von einer erheblich verzögerten, hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten sprechen muss. Weiterhin wurde eine veränderte Lokalisation der kolumnaren und hypertrophen Chondrozyten in den Gliedmaßen der *Hoxa11^{-/-};Hoxd11^{-/-}*- und *Ulnaless*-Mutanten beobachtet, die ein Indiz für die Funktion von *Hoxa11* und *Hoxd11* in der Anordnung der Chondrozyten

in der Wachstumsfuge ist. *Hoxa11* und *Hoxd11* sind demnach notwendig, um eine exakte, zeitliche und räumliche Abfolge der Chondrozytendifferenzierung in Ulna und Radius zu ermöglichen.

Obwohl die Chondrozytendifferenzierung in der Ulna von *Ulnaless*-Gliedermaßen mit der Differenzierung der Chondrozyten in Ulna und Radius von *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-}-Extremitäten vergleichbar ist, so wurden doch auch Unterschiede zwischen den Vordergliedmaßen dieser beiden Mauslinien gefunden. Durch die Analyse von postnatalen *Ulnaless*-Vorderextremitäten wurde offensichtlich, dass in *Ulnaless*-Mutanten nur das Olecranon vorhanden ist. Demnach sind *Hoxa11* und *Hoxd11* auch für die Bildung der distalen Ulna verantwortlich.

Durch die molekulare Analyse der Vorderextremitäten beider Mauslinien wurde *Shox2* als potentiell Zielgen von *Hoxa11* und *Hoxd11* detektiert. Ob diese posterioren *Hox*-Gene *Shox2* aktivieren können und dadurch die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten induziert wird, soll in weiteren Experimenten durch Analyse des *Shox2*-Promotors und durch Überexpression von *Shox2* in *Ulnaless*-Gliedermaßen geklärt werden.

Des Weiteren wurde eine Analyse des *Ihh*-Promotors durchgeführt, um zu verstehen, wie *Ihh* während der Chondrozytendifferenzierung reguliert wird. Es wurden konservierte Bereiche im genomischen 5'Bereich von *Ihh* nachgewiesen und auf Enhancer-Aktivität *in vitro* und *in vivo* getestet. *In vivo* konnte keine Enhancer-Aktivität der untersuchten, genomischen Sequenzen ermittelt werden. Vermutlich sind längere Fragmente oder weiter entfernte Sequenzen notwendig, um die Expression von *Ihh* in den Gliedmaßen zu regulieren. *In vitro* wurde dagegen das T1-Fragment als *Ihh*-Enhancer identifiziert. Als Aktivatoren der *Ihh*-Expression wurden die Homöobox-Transkriptionsfaktoren SHOX und SHOX2 detektiert. Eine Repression erfolgte *in vitro* durch BMP2 sowie mit HOXA9, *Hoxa11* und *Hoxd11*. Als weiterer, putativer Aktivator von *Ihh* wurde MMP3 in einem Hefe-Ein-Hybrid System identifiziert. Zur Bestätigung der Regulation der *Ihh*-Expression durch MMP3 sind elektrophoretische Mobilitätstests oder Luciferase-Assays notwendig. Insgesamt konnten durch diese Promotor-Analyse neue Regulatoren von *Ihh* und somit der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten ermittelt werden.

7. Abstract

Hox genes are major regulators of limb development. They are defining the identity of specific limb elements by their overlapping expression patterns. *Hoxa11* and *Hoxd11* are essential factors for the formation of ulna and radius, which was shown by the severe reduction in size of these bones in *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} double mutant mice (Boulet und Capecchi, 2004; Davis et al., 1995). Beside the function of *Hox* genes in specifying the elements of the limbs, it was indicated in *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} mice that *Hox* genes also play a role in chondrocyte differentiation (Boulet und Capecchi, 2004). In this study, the impact of *Hoxa11* und *Hoxd11* on chondrocyte differentiation was investigated by analyzing the forelimbs of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} mice. The likelihood to get *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} double mutant embryos is 6,25%. Therefore, the forelimbs of mice with the dominant *Ulnaless* mutation were analyzed in addition. Because of the dominance of this mutation, the frequency to get a mutant *Ulnaless* embryo is around 50%. The *Ulnaless* mice serve as model for the *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} mutation, because in these mice the complete *Hoxd* cluster is inverted, which causes the repression of the *Hoxa11* and *Hoxd11* function. That's why, the *Ulnaless* forelimbs show the same phenotype as *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} forelimbs.

The comparison of chondrocyte differentiation in forelimbs of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} and *Ulnaless* mice demonstrated that only the ulna of *Ulnaless* embryos is influenced by the ectopic expression of *Hoxd12* and *Hoxd13*. Therefore, only the ulna of *Ulnaless* mutants can be used as a model for the *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} mutation. Furthermore, the inhibition of chondrocyte differentiation was shown at E14.5 and E16.5 in the zeugopod of both mouse strains on the morphological and molecular level. At these stages, chondrocytes of an early differentiation step were detected in ulna and radius of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} and *Ulnaless* forelimbs, whereas at later stages, columnar and hypertrophic chondrocytes could be seen in the zeugopod of the mutants. In conclusion, chondrocyte differentiation in the zeugopod of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} and *Ulnaless* mice is severely delayed. Additionally, the change in the localization of columnar and hypertrophic chondrocytes in the forelimbs of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} and *Ulnaless* mice showed that *Hoxa11* and *Hoxd11* also have a function in aligning the chondrocytes in the growth plate. In summary, *Hoxa11* and *Hoxd11* are necessary to allow the correct temporal and spatial organization of chondrocyte differentiation in ulna and radius.

Although chondrocyte differentiation in the ulna of *Ulnaless* forelimbs is comparable to the differentiation in ulna and radius of *Hoxa11*^{-/-};*Hoxd11*^{-/-} limbs, some differences were observed between the forelimbs of the two mouse strains. The analysis of *Ulnaless* forelimbs at postnatal stages demonstrated the exclusive presence of the olecranon process in *Ulnaless* forelimbs. Thus, *Hoxa11* and *Hoxd11* are responsible for the formation of the distal ulna.

The molecular analysis of the forelimbs of both mutant mouse strains indicated that *Shox2* is a target of *Hoxa11* and *Hoxd11*. To confirm this, further analysis of the *Shox2* promoter or overexpression of *Shox2* in the forelimbs of *Ulnaless* mice could be done to see if a rescue of the chondrocyte differentiation defect occurs.

Besides, the promoter of *Ihh* was analyzed to get a better understanding of the regulation of *Ihh* during chondrocyte differentiation. Conserved elements of the genomic upstream region of *Ihh* were identified and examined *in vitro* and *in vivo* for enhancer activity. *In vivo*, no enhancer activity could be detected with either fragment. Presumably, longer fragments or more distant sequences are needed to drive the expression of *Ihh* in the limbs. But *in vitro* the T1 fragment was identified as an enhancer of *Ihh*. Furthermore, SHOX and SHOX2 were proved to act as activators of this *Ihh* enhancer. In contrast, BMP2 as well as the homeobox proteins HOXA9, *Hoxa11* and *Hoxd11* repressed the enhancer activity. As another transcriptional activator of *Ihh* expression, MMP3 was found in a yeast one hybrid assay. To confirm this regulation of *Ihh* expression by MMP3, gel shifts or luciferase assays are useful. In summary, this study identified novel regulators of *Ihh* and of chondrocyte hypertrophy.

8. Literaturverzeichnis

- Akita, H., Sasaki, Y., Yamada, T., Gotoh, K., Ohigashi, H., Eguchi, H., Yano, M., Ishikawa, O., Imaoka, S., 2008. Real-time intraoperative assessment of residual liver functional reserve using pulse dye densitometry. *World J Surg.* 32, 2668-74.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science.
- Albrecht, A. N., Kornak, U., Boddich, A., Suring, K., Robinson, P. N., Stiege, A. C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E. E., Mundlos, S., 2004. A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Human Molecular Genetics.* 13, 2351-2359.
- Bateson, W., 1894. *Materials for the study of variation*. London: Macmillan.
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22, 85-9.
- Bitgood, M. J., McMahon, A. P., 1995. Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell-Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Developmental Biology.* 172, 126-138.
- Boulet, A. M., Capecchi, M. R., 2004. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development.* 131, 299-309.
- Brooks, A. R., Nagy, B. P., Taylor, S., Simonet, W. S., Taylor, J. M., Levy-Wilson, B., 1994. Sequences containing the second-intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B gene in the livers of transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 14, 2243-56.
- Cao, J., Rehemtulla, A., Pavlaki, M., Kozarekar, P., Chiarelli, C., 2005. Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-Golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. *J Biol Chem.* 280, 10974-80.
- Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J., Kozak, C. A., Reddi, A. H., Moos, M., Jr., 1994. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem.* 269, 28227-34.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., Beachy, P. A., 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743-8.
- Cobb, J., Dierich, A., Huss-Garcia, Y., Duboule, D., 2006. A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 4511-5.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L., 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69, 2110-4.

- Crick, A. P., Babbs, C., Brown, J. M., Morriss-Kay, G. M., 2003. Developmental mechanisms underlying polydactyly in the mouse mutant Doublefoot. *J Anat.* 202, 21-6.
- Davis, A. P., Capecchi, M. R., 1994. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development.* 120, 2187-98.
- Davis, A. P., Witte, D. P., Hsieh-Li, H. M., Potter, S. S., Capecchi, M. R., 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature.* 375, 791-5.
- Davisson, M. T., Cattanaach, B. M., 1990. The mouse mutation *ulnaless* on chromosome 2. *J Hered.* 81, 151-3.
- Desbiens, X., Meunier, L., Lassalle, B., 1990. Specific effects of retinoic acid on the skeletal morphogenesis of the 11-day mouse embryo forelimb bud in vitro. *Biol Cell.* 68, 213-20.
- Deschamps, J., 2004. Developmental biology. Hox genes in the limb: a play in two acts. *Science.* 304, 1610-1.
- Dolle, P., Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Renucci, A., Duboule, D., 1989. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature.* 342, 767-72.
- Duboule, D., 1991. Patterning in the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev.* 1, 211-6.
- Eguchi, T., Kubota, S., Kawata, K., Mukudai, Y., Uehara, J., Ohgawara, T., Ibaragi, S., Sasaki, A., Kuboki, T., Takigawa, M., 2008. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol.* 28, 2391-413.
- Elima, K., Eerola, I., Rosati, R., Metsaranta, M., Garofalo, S., Perala, M., De Crombrughe, B., Vuorio, E., 1993. The mouse collagen X gene: complete nucleotide sequence, exon structure and expression pattern. *Biochem J.* 289 (Pt 1), 247-53.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E., Derynck, R., 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell.* 80, 371-8.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Doll e, P., Chambon, P., 1996a. Specific and redundant functions of the paralogous *Hoxa-9* and *Hoxd-9* genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development.* 122, 461-72.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dolle, P., Chambon, P., 1996b. *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development.* 122, 2997-3011.
- Gack, S., Vallon, R., Schmidt, J., Grigoriadis, A., Tuckermann, J., Schenkel, J., Weiher, H., Wagner, E. F., Angel, P., 1995. Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ.* 6, 759-67.

- Gilbert, S. F., 2003. *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Gong, K. Q., Yallowitz, A. R., Sun, H., Dressler, G. R., Wellik, D. M., 2007. A Hox-Eya-Pax complex regulates early kidney developmental gene expression. *Mol Cell Biol.* 27, 7661-8.
- Gonzalez, F., Duboule, D., Spitz, F., 2007. Transgenic analysis of Hoxd gene regulation during digit development. *Dev Biol.* 306, 847-59.
- Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A., Scott, M. P., 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* 10, 301-12.
- Graham, A., Papalopulu, N., Krumlauf, R., 1989. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell.* 57, 367-78.
- Hasky-Negev, M., Simsa, S., Tong, A., Genina, O., Monsonego Ornan, E., 2008. Expression of matrix metalloproteinases during vascularization and ossification of normal and impaired avian growth plate. *J Anim Sci.* 86, 1306-15.
- Hayes, C., Lyon, M. F., Morriss-Kay, G. M., 1998. Morphogenesis of Doublefoot (Dbf), a mouse mutant with polydactyly and craniofacial defects. *J Anat.* 193 (Pt 1), 81-91.
- Herault, Y., Fraudeau, N., Zakany, J., Duboule, D., 1997. Ulnaless (Ul), a regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior Hoxd genes. *Development.* 124, 3493-500.
- Hogan, B. L., Constantini, F., Lacy, E., 1986. *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hostikka, S. L., Capecchi, M. R., 1998. The mouse Hoxc11 gene: genomic structure and expression pattern. *Mech Dev.* 70, 133-45.
- Hynes, R. O., 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 110, 673-687.
- Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Dolle, P., Renucci, A., Duboule, D., 1991. Murine genes related to the Drosophila AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 10, 2279-89.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A., Olsen, G., 1990. Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. *Adv Genet.* 27, 309-62.
- Kaufmann, M. H., 1992. *The atlas of mouse development*. San Diego. Academic press.
- Keeler, R. F., 1970. Teratogenic compounds of Veratrum californicum (Durand) X. Cyclopia in rabbits produced by cyclopamine. *Teratology.* 3, 175-80.

- Keeler, R. F., 1973. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). XIV. Limb deformities produced by cyclopamine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 142, 1287-91.
- Kim, I. S., Otto, F., Zabel, B., Mundlos, S., 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev.* 80, 159-70.
- Kishore, G. M., Shah, D. M., 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem.* 57, 627-63.
- Kmita, M., Fraudeau, N., Herault, Y., Duboule, D., 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of *Hoxd* genes in limbs. *Nature.* 420, 145-50.
- Kmita, M., Tarchini, B., Zakany, J., Logan, M., Tabin, C. J., Duboule, D., 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking *HoxA/HoxD* gene function. *Nature.* 435, 1113-6.
- Kronenberg, H. M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 423, 332-6.
- Krumlauf, R., 1994. *Hox* genes in vertebrate development. *Cell.* 78, 191-201.
- Kuss, P., Villavicencio-Lorini, P., Witte, F., Klose, J., Albrecht, A. N., Seemann, P., Hecht, J., Mundlos, S., 2009. Mutant *Hoxd13* induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis. *J Clin Invest.* 119, 146-56.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.
- Langston, A. W., Thompson, J. R., Gudas, L. J., 1997. Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the *Hox A* and *Hox B* homeobox gene clusters. Functional analysis. *J Biol Chem.* 272, 2167-75.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., 1996. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 273, 663-6.
- Lee, K., Deeds, J. D., Segre, G. V., 1995. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology.* 136, 453-63.
- Lefebvre, V., de Crombrughe, B., 1998. Toward understanding *SOX9* function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 16, 529-40.
- Lettice, L. A., Heaney, S. J., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., de Graaff, E., 2003. A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet.* 12, 1725-35.

- Lettice, L. A., Horikoshi, T., Heaney, S. J., van Baren, M. J., van der Linde, H. C., Breedveld, G. J., Joosse, M., Akarsu, N., Oostra, B. A., Endo, N., Shibata, M., Suzuki, M., Takahashi, E., Shinka, T., Nakahori, Y., Ayusawa, D., Nakabayashi, K., Scherer, S. W., Heutink, P., Hill, R. E., Noji, S., 2002. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7548-53.
- Lewis, E. B., 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 276, 565-70.
- Li, J. J., Herskowitz, I., 1993. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science.* 262, 1870-4.
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y., McMahon, A. P., 2001. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development.* 128, 5099-108.
- Lottspeich, F., Zorbas, H., 1998. *Bioanalytik.* Spektrum Akademischer Verlag.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Marchini, A., Marttila, T., Winter, A., Caldeira, S., Malanchi, I., Blaschke, R. J., Hacker, B., Rao, E., Karperien, M., Wit, J. M., Richter, W., Tommasino, M., Rappold, G. A., 2004. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem.* 279, 37103-14.
- Massip, L., Ectors, F., Deprez, P., Maleki, M., Behets, C., Lengele, B., Delahaut, P., Picard, J., Rezsohazy, R., 2007. Expression of *Hoxa2* in cells entering chondrogenesis impairs overall cartilage development. *Differentiation.* 75, 256-67.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., Mobashery, S., 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 12, 1075-95.
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K., Shiroishi, T., 1995. A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev.* 9, 1645-53.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Wills, N. M., Gesteland, R. F., Atkins, J. F., 1996. Reading two bases twice: mammalian antizyme frameshifting in yeast. *EMBO J.* 15, 1360-70.
- McGinnis, W., Krumlauf, R., 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell.* 68, 283-302.
- Mello, M. A., Tuan, R. S., 1999. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35, 262-9.
- Minina, E., Schneider, S., Rosowski, M., Lauster, R., Vortkamp, A., 2005. Expression of *Fgf* and *Tgfbeta* signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr Patterns.* 6, 102-9.

- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P., Vortkamp, A., 2001. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 128, 4523-34.
- Montavon, T., Le Garrec, J. F., Kerszberg, M., Duboule, D., 2008. Modeling Hox gene regulation in digits: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes Dev*. 22, 346-59.
- Morris, T., 1967. New mutants. *Mouse News Letter*.
- Muller, F., Chang, B., Albert, S., Fischer, N., Tora, L., Strahle, U., 1999. Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development*. 126, 2103-16.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155, 335-50.
- Nah, H. D., Swoboda, B., Birk, D. E., Kirsch, T., 2001. Type IIA procollagen: expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage. *Dev Dyn*. 220, 307-22.
- Nelson, L. T., Rakshit, S., Sun, H., Wellik, D. M., 2008. Generation and expression of a Hoxa11eGFP targeted allele in mice. *Dev Dyn*. 237, 3410-6.
- Ng, L. J., Tam, P. P., Cheah, K. S., 1993. Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage and nonchondrogenic tissues during early mouse development. *Dev Biol*. 159, 403-17.
- Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S., Koopman, P., 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*. 183, 108-21.
- Niederreither, K., Dolle, P., 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet*. 9, 541-53.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U. C., Chambon, P., Dolle, P., 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev*. 62, 67-78.
- Okada, Y., Harris, E. D., Jr., Nagase, H., 1988. The precursor of a metalloendopeptidase from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and mechanisms of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem J*. 254, 731-41.
- Olsen, B. R., Reginato, A. M., Wang, W., 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16, 191-220.
- Otting, G., Qian, Y. Q., Billeter, M., Muller, M., Affolter, M., Gehring, W. J., Wuthrich, K., 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J*. 9, 3085-92.

- Papenbrock, T., Visconti, R. P., Awgulewitsch, A., 2000. Loss of fibula in mice overexpressing Hoxc11. *Mech Dev.* 92, 113-23.
- Peichel, C. L., Abbott, C. M., Vogt, T. F., 1996. Genetic and physical mapping of the mouse *Ulnaless* locus. *Genetics.* 144, 1757-67.
- Peichel, C. L., Prabhakaran, B., Vogt, T. F., 1997. The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior HoxD gene expression and alters appendicular patterning. *Development.* 124, 3481-92.
- Peters, K. G., Werner, S., Chen, G., Williams, L. T., 1992. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 114, 233-43.
- Qu, S., Niswender, K. D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M. A., Wisdom, R., 1997. Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development.* 124, 3999-4008.
- Rao, E., Blaschke, R. J., Marchini, A., Niesler, B., Burnett, M., Rappold, G. A., 2001. The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene *SHOX* encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet.* 10, 3083-91.
- Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S., Lyons, K. M., 2009. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development.* 136, 1093-104.
- Sagai, T., Amano, T., Tamura, M., Mizushina, Y., Sumiyama, K., Shiroishi, T., 2009. A cluster of three long-range enhancers directs regional *Shh* expression in the epithelial linings. *Development.* 136, 1665-74.
- Schneuwly, S., Klemenz, R., Gehring, W. J., 1987. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature.* 325, 816-8.
- Seki, K., Hata, A., 2004. Indian hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem.* 279, 18544-9.
- Sharpe, J., Lettice, L., Hecksher-Sorensen, J., Fox, M., Hill, R., Krumlauf, R., 1999. Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*. *Curr Biol.* 9, 97-100.
- Si-Tayeb, K., Monvoisin, A., Mazzocco, C., Lepreux, S., Decossas, M., Cubel, G., Taras, D., Blanc, J. F., Robinson, D. R., Rosenbaum, J., 2006. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol.* 169, 1390-401.
- Small, K. M., Potter, S. S., 1993. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev.* 7, 2318-28.
- Spatier, D., Hill, T. P., O'Sullivan, R. J., Gruber, M., Conner, D. A., Hartmann, C., 2006. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of *Ihh* during chondrogenesis. *Development.* 133, 3039-49.
- Spitz, F., Gonzalez, F., Duboule, D., 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell.* 113, 405-17.

- Spitz, F., Gonzalez, F., Peichel, C., Vogt, T. F., Duboule, D., Zakany, J., 2001. Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. *Genes Dev.* 15, 2209-14.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A. P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-86.
- Stock, M., Schafer, H., Stricker, S., Gross, G., Mundlos, S., Otto, F., 2003. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *Journal of Biological Chemistry.* 278, 17360-17367.
- Strathdee, G., Sim, A., Brown, R., 2004. Control of gene expression by CpG island methylation in normal cells. *Biochem Soc Trans.* 32, 913-5.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., Mundlos, S., 2002. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Developmental Biology.* 245, 95-108.
- Suzuki, M., Kuroiwa, A., 2002. Transition of Hox expression during limb cartilage development. *Mech Dev.* 118, 241-5.
- Tagariello, A., Luther, J., Streiter, M., Didt-Kozziel, L., Wuelling, M., Surmann-Schmitt, C., Stock, M., Adam, N., Vortkamp, A., Winterpacht, A., 2008. Ucma--A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biol.* 27, 3-11.
- Tarchini, B., Duboule, D., Kmita, M., 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature.* 443, 985-8.
- Valerius, M. T., Patterson, L. T., Feng, Y., Potter, S. S., 2002. Hoxa 11 is upstream of Integrin alpha8 expression in the developing kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8090-5.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., Tabin, C. J., 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 273, 613-22.
- Wedden, S. E., Lewin-Smith, M. R., Tickle, C., 1987. The effects of retinoids on cartilage differentiation in micromass cultures of chick facial primordia and the relationship to a specific facial defect. *Dev Biol.* 122, 78-89.
- Williams, M. E., Lehoczy, J. A., Innis, J. W., 2006. A group 13 homeodomain is neither necessary nor sufficient for posterior prevalence in the mouse limb. *Dev Biol.* 297, 493-507.
- Wright, E., Hargrave, M. R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., Koopman, P., 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 9, 15-20.
- Yamaai, T., Nakanishi, T., Asano, M., Nawachi, K., Yoshimichi, G., Ohyama, K., Komori, T., Sugimoto, T., Takigawa, M., 2005. Gene expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in calcifying tissues of normal and cbfa1-null mutant mice in late stage of embryonic development. *J Bone Miner Metab.* 23, 280-8.

- Yang, Y., Guillot, P., Boyd, Y., Lyon, M. F., McMahon, A. P., 1998. Evidence that preaxial polydactyly in the Doublefoot mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling. *Development*. 125, 3123-32.
- Yee, S. P., Rigby, P. W., 1993. The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev*. 7, 1277-89.
- Yokouchi, Y., Nakazato, S., Yamamoto, M., Goto, Y., Kameda, T., Iba, H., Kuroiwa, A., 1995. Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes Dev*. 9, 2509-22.
- Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., Komori, T., 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. 18, 952-63.
- Yu, L., Liu, H., Yan, M., Yang, J., Long, F., Muneoka, K., Chen, Y., 2007. Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol*. 306, 549-59.
- Yueh, Y. G., Gardner, D. P., Kappen, C., 1998. Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 9956-61.
- Zakany, J., Kmita, M., Duboule, D., 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science*. 304, 1669-72.
- Zhang, Z., Gerstein, M., 2003. Of mice and men: phylogenetic footprinting aids the discovery of regulatory elements. *J Biol*. 2, 11.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B., 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn*. 209, 377-86.
- Zhou, G., Garofalo, S., Mukhopadhyay, K., Lefebvre, V., Smith, C. N., Eberspaecher, H., de Crombrughe, B., 1995. A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci*. 108 (Pt 12), 3677-84.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D., O'Keefe, R. J., 2008. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest*. 118, 429-38.

9. Anhang

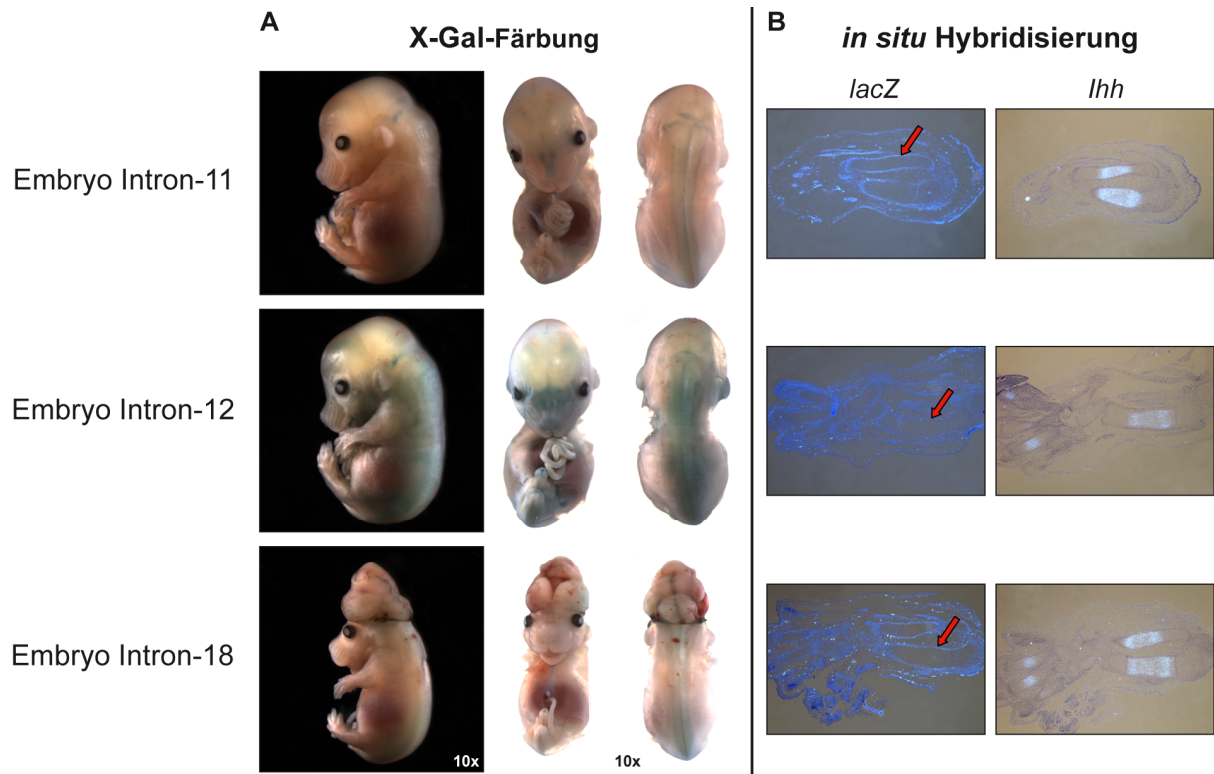


Abb. 9.1: Transgene Embryonen für Intron-pGZ40. A: X-Gal-Färbung der transgenen Embryonen, 12,5x Vergrößerung (wenn nicht anders angegeben); B: *In situ* Hybridisierung auf Hintergliedmaßen der transgenen Embryonen mit antisense-Sonden für *lacZ* und *Ihh*, Pfeile markieren die *Ihh*-Expressionsdomäne, 50x Vergrößerung.

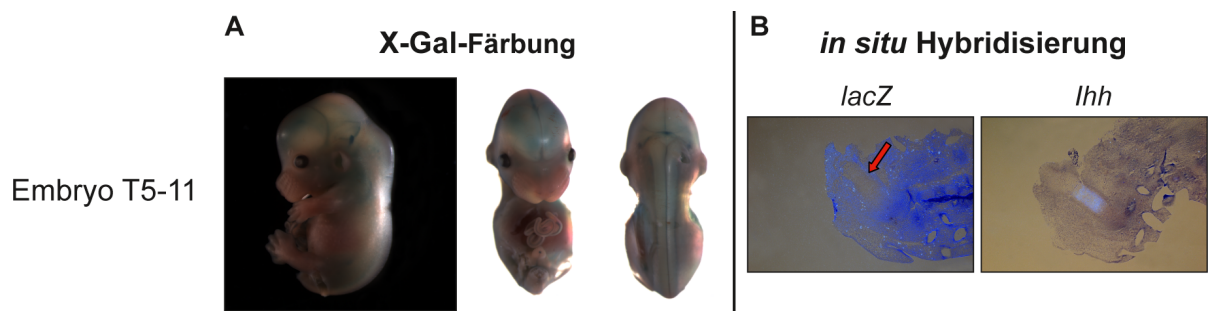


Abb. 9.2: Transgene Embryonen für T5-pGZ40. A: X-Gal-Färbung der transgenen Embryonen, 12,5x Vergrößerung (wenn nicht anders angegeben); B: *In situ* Hybridisierung auf Hintergliedmaßen der transgenen Embryonen mit antisense-Sonden für *lacZ* und *Ihh*, Pfeile markieren die *Ihh*-Expressionsdomäne, 50x Vergrößerung.

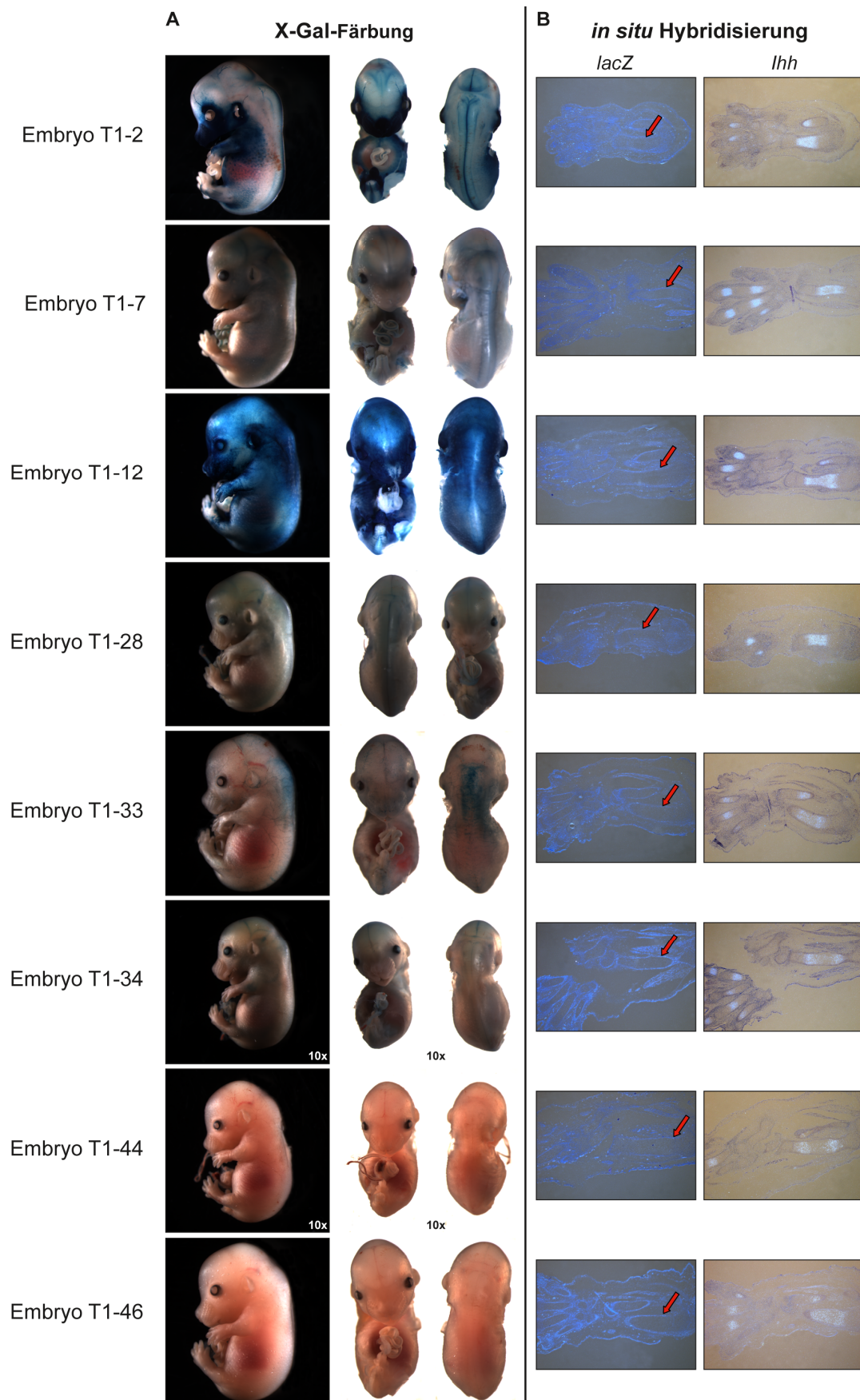


Abb. 9.3: Transgene Embryonen für T1-pGZ40. A: X-Gal-Färbung der transgenen Embryonen, 12,5x Vergrößerung (wenn nicht anders angegeben); B: *In situ* Hybridisierung auf Hintergliedmaßen der transgenen Embryonen mit antisense-Sonden für *lacZ* und *Ihh*, Pfeile markieren die *Ihh*-Expressionsdomäne, 50x Vergrößerung.

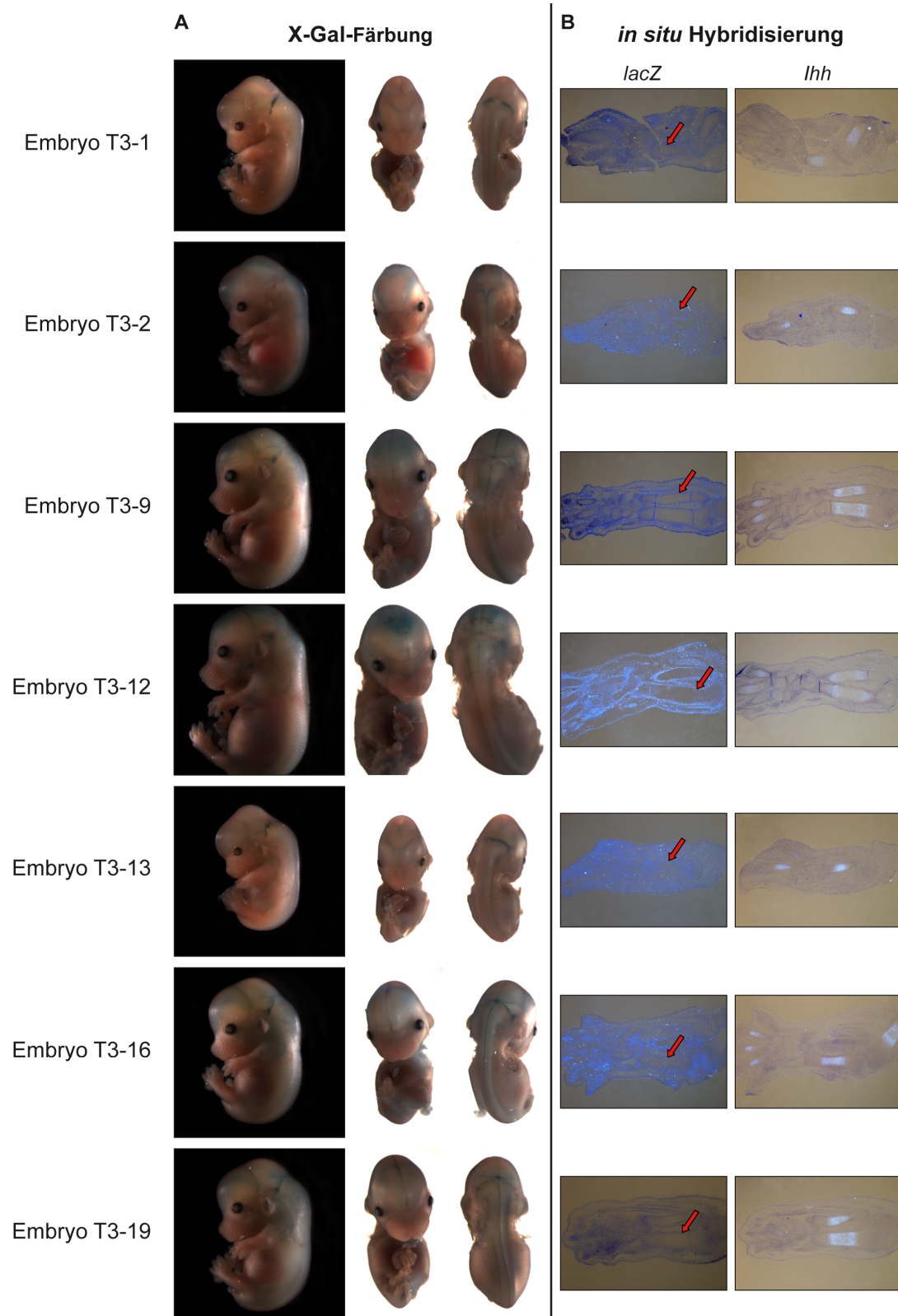


Abb. 9.4: Transgene Embryonen für T3-pGZ40. A: X-Gal-Färbung der transgenen Embryonen, 12,5x Vergrößerung (wenn nicht anders angegeben); B: *In situ* Hybridisierung auf Hintergliedmaßen der transgenen Embryonen mit antisense-Sonden für *lacZ* und *Ihh*, Pfeile markieren die *Ihh*-Expressionsdomäne, 50x Vergrößerung.

Tab. 3: Sequenzierungsergebnisse der isolierten Klone des Hefe-Ein-Hybrid Systems.

Klon	Sequenzierungsergebnis	Bemerkung
1	pACT2, DTN-B2	Vektor
3	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1)	3'UTR
5	KIAA0256	kein Leserahmen
6	beta-2 Microglobulin	Leserahmenverschiebung
7	AE binding protein 1 (AEBP1)	Leserahmenverschiebung
8	Lumican	Leserahmenverschiebung
12	Lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 (LPGAT1)	3'UTR
13	Phosphoglycerate kinase 1	Leserahmenverschiebung
14	pACT2, Zinc finger protein	Vektor
15	MMP3+10	Leserahmenverschiebung
16	pACT2	Vektor
17	Chitinase 3-like 1 (CHI3L1)	im Leserahmen
18	40S ribosomal Protein SA	kein Leserahmen
21	Alpha crystallin B chain	kein Leserahmen
22	Sjogren syndrome antigen B (SSB)	im Leserahmen
23	MMP3	kein Leserahmen, aber eigenes ATG
24	KIAA0469	Leserahmenverschiebung
25	Testican	kein Leserahmen
26	Cartilage link protein	kein Leserahmen
27	pGL4	
32	ATPase class VI type 11B	kein Leserahmen
33	RNA-binding region-containing protein2	kein Leserahmen
34	GRB10 interacting GYF protein1 (GIGYF1)	kein Leserahmen
36	pACT2	Vektor
39	Chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2)	Leserahmenverschiebung
41	genomische DNA	
42	Nuclear pore complex-associated protein TPR	kein Leserahmen
44	Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)	3'UTR
45	MMP3	Leserahmenverschiebung
46	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2 (Serpine2)	kein Leserahmen

Klon	Sequenzierungsergebnis	Bemerkung
51	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP)	Leserahmenverschiebung
52	Forkhead box 03 (FOXO3)	kein Leserahmen
55	ARP2 actin-related protein 2 (ACTR2)	kein Leserahmen
57	Heat shock protein 1 (HSPB1)	kein Leserahmen
58	Biglycan	im Leserahmen
60	Lumican	kein Leserahmen
61	Decorin	kein Leserahmen
62	Caldesmon1	kein Leserahmen
65	Chitinase-3 like protein1 (CHI3LI)	im Leserahmen
66	Gamma-glutamyl hydrolase (GGH)	Leserahmenverschiebung
67	Lumican	Leserahmenverschiebung
68	Follistatin-like 1 (FSTL1)	kein Leserahmen
69	Complement C1r subcomponent (C1R)	Leserahmenverschiebung
70	genomische DNA	kein Leserahmen
73	Chitinase-3 like protein1 (CHI3LI)	im Leserahmen
74	Translocase of inner mitochondrial membrane 22 (TIM22)	kein Leserahmen
75	Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1)	kein Leserahmen
77	Interleukin 8 (IL8)	kein Leserahmen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp, die mir die Anfertigung meiner Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie ermöglichte. Weiterhin bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Dr. Manuela Wuelling für die ausgezeichnete Betreuung, das intensive Korrekturlesen des Manuskripts und konstruktive Kritik.

Ein großes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter des Vortkamp-Labors für die hervorragende Zusammenarbeit, die stetige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Vielen Dank auch an Dr. Ralph Waldschütz und Wojtek Wegrzyn für die Generierung transgener Embryonen am Universitätsklinikum Essen.

Für die ausführliche Hilfe bei statistischen Fragen bedanke ich mich bei Prof. Dr. Daniel Hofmann.

Ein ganz besonderer Dank geht an Christian Groß für sein Verständnis für meine Arbeit und seine Hilfe nicht nur während des Schreibens dieses Manuskripts.

Mein allergrößter Dank geht an meine Familie, besonders an meine Eltern, für die großartige Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Publikationen

Werner, S. und Vortkamp A., Early chondrocyte differentiation is regulated by *Hox* genes. (Manuskript in Bearbeitung).

Werner, S. und Vortkamp A. 2009. 21-P032 Regulation of chondrocyte differentiation by posterior Hox genes, Mech Dev. 126, Suppl. 1, S322-S323

Poster

Werner, S. und Vortkamp, A., 2009. Regulation of chondrocyte differentiation by posterior *Hox* genes. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh, Großbritannien.

Werner, S., Wüiling, M., Vortkamp, A., 2008. Comparative analysis of *Ulnaless* and *Hoxa11/d11* double mutant mice. 20. International Congress of Genetics, Berlin, Deutschland.

Werner, S., Wüiling, M., Vortkamp, A., 2007. *Ulnaless*, a mouse model for studying *HoxD* gene function during cartilage development. 6. Forschungstag der medizinischen Fakultät, Essen, Deutschland

Werner, S., Wüiling, M., Vortkamp, A., 2007. *Ulnaless*, a mouse model for studying HoxD gene function during cartilage development. Gordon Research Conference-Cartilage Biology & Pathology, Ventura, USA.

Werner, S., Wüiling, M., Vortkamp, A., 2006. Role of *Hox* genes during cartilage development. BSDB Autumn Meeting 2006, Dundee, Großbritannien.

Vorträge

Werner, S., 2008. Comparative analysis of *Ulnaless* and *Hoxa11/d11* double mutant mice. Annual Retreat of the DFG Graduate Training Program "Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation", Dormagen-Zons, Deutschland

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Werner
Vorname	Stefanie
Geburtsdatum und -ort	08.08.1979 in Düsseldorf
Anschrift	Scharnhorststr. 45, 44147 Dortmund
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Promotion

10/2005 - heute	Dissertation Thema: „Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch posteriore <i>Hox</i> -Gene“ Betreuung durch Prof. Dr. A. Vortkamp am Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB) in der Abteilung für Entwicklungsbiologie, Universität Duisburg-Essen
-----------------	---

Studium

23.02.2005	Diplom-Biologin, Note: sehr gut
03/2004 – 12/2004	Diplomarbeit Thema: „Generierung einer <i>mGBP2</i> -defizienten Mauslinie“ Betreuung durch Prof. Dr. K. Pfeffer und Prof. Dr. C. Esser am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/1999 – 02/2005	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Schwerpunkte: Biochemie, Molekularbiologie, Organische Chemie

Schule

25.05.1999	Abschluss: Abitur , Note: 2,7
08/1990 – 05/1999	Theodor-Heuss-Gymnasium, Ratingen

Dortmund, 12.02.2010

(Stefanie Werner)

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch posteriore *Hox*-Gene“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Stefanie Werner befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Stefanie Werner)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Stefanie Werner)